

Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Philipps-Universität Marburg
Abteilung Molekulare Neurowissenschaften
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Eberhard Weihe



Die Rolle der Neuropeptide
Calcitonin gene-related Peptide und
Pituitary adenylate cyclase-activating Peptide
im Superoxiddismutase 1 Mausmodell
der amyotrophen Lateralsklerose

INAUGURALDISSERTATION
zur Erlangung des Grades des Dr. rer. physiol.

dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Cornelia Ringer
aus Rotenburg an der Fulda

Marburg an der Lahn, im August 2011

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

am: 25. November 2011

Dekan: Prof. Dr. Matthias Rothmund

1. Referent: PD Dr. Burkhard Schütz

1. Koreferent: Prof. Dr. Richard Dodel

Inhalt

Zusammenfassung.....	1
Summary	3
1 Einleitung.....	5
1.1 Die amyotrophe Lateralsklerose	5
1.1.1 Symptomatik und Ätiologie beim Menschen	5
1.1.2 Ursachen der ALS	6
1.1.3 Molekulare Mechanismen der Motoneuronendegeneration	7
1.1.3.1 SOD1-Mutationen	8
1.1.3.2 Mitochondriopathien	10
1.1.3.3 Erregungstoxizität	11
1.1.3.4 Oxidativer Stress	12
1.1.4 Neuroinflammation als Motor der ALS-Progression	13
1.1.4.1 Ursachen und Folgen der Astroglia-Aktivierung in der ALS	14
1.1.4.2 Ursachen und Folgen der Mikroglia-Aktivierung in der ALS	15
1.1.4.3 Infiltration von T-Lymphozyten	16
1.1.4.4 Zeitverlauf und Mechanismen der Neuroinflammation in der ALS	17
1.1.5 Die ALS als multifaktorielle Erkrankung	18
1.2 Calcitonin gene-related peptide (CGRP)	20
1.2.1 Expressionsprofil	21
1.2.2 Rezeptoren und intrazelluläre Signalwege	22
1.2.3 Physiologische Funktionen	24
1.2.3.1 CGRP als Modulator von peripherer und zentraler Inflammation	24
1.2.3.2 CGRP als Modulator an der neuromuskulären Endplatte	25
1.2.4 CGRP in der Pathogenese der amyotrophen Lateralsklerose	26
1.3 Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide	28
1.3.1 Expressionsprofil	29
1.3.2 Rezeptoren und intrazelluläre Signalwege	30
1.3.3 Physiologische Funktionen	32
1.3.3.1 PACAP als potenter neuroprotektiver Faktor	33
1.3.3.2 <i>In vitro</i> -Effekte an Neuronen	33
1.3.3.3 <i>In vitro</i> -Effekte an Astrozyten	34
1.3.3.4 <i>In vitro</i> -Effekte an Mikroglia	34
1.3.3.5 Neuroprotektive Effekte <i>in vivo</i>	34
1.4 Zielsetzungen der vorliegenden Arbeit	36
1.4.1 Aufklärung der Rolle von CGRP in der ALS	36
1.4.2 Aufklärung der Rolle von PACAP in der ALS	38
2 Material und Methoden	39
2.1 Versuchstiere	39
2.1.1 Verwendete Mausstämme	39
2.1.1.1 SOD1-transgener Mausstamm	39
2.1.1.2 RAMP1 defizienter Mausstamm	40
2.1.1.3 α CGRP defizienter Mausstamm	40
2.1.1.4 β CGRP defizienter Mausstamm	40
2.1.1.5 PACAP defizienter Mausstamm	41
2.1.2 Genotypisierung	41
2.1.3 Dokumentation des Krankheitsverlaufes SOD1-transgener Tiere	42
2.1.3.1 Paw Grip Endurance (PaGE) Test	42
2.1.3.2 Grip Strength Test	42
2.1.3.3 Licking Test	43
2.1.4 Statistische Analyse	44
2.2 Gewebepreparation	44

2.2.1	Fixierung	44
2.2.1.1	Bouin Hollande Fixierung	44
2.2.1.2	Fixierung in Paraformaldehyd (PFA)	44
2.2.1.3	Asservierung von Kryogewebe	45
2.2.1.4	Asservierung von Gewebe zur RNA-Extraktion	45
2.2.2	Anfertigung der Gewebeschnitte	45
2.2.2.1	Silianisierung der Objektträger	45
2.2.2.2	Schneiden der Gewebe	45
2.2.3	Histologische Färbungen	46
2.2.3.1	Giemsa-Färbung	46
2.2.3.2	Kresylviolett-Färbung	46
2.3	Primäre Astrozytenkultur	47
2.4	Laser-Mikrodissektion	48
2.5	Molekulare und Mikrobiologische Verfahren	49
2.5.1	Allgemeine Molekularbiologische Methoden	49
2.5.1.1	Extraktion genomischer DNA	49
2.5.1.2	RNA-Extraktion aus Geweben	49
2.5.1.3	RNA-Extraktion aus Zellen	49
2.5.1.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	51
2.5.1.5	DNase-Verdau	51
2.5.1.6	Reverse Transkription	52
2.5.1.7	Polymerasekettenreaktion	53
2.5.1.8	Agarose-Gelelektrophorese	54
2.5.1.9	Gelextraktion	55
2.5.2	Klonierung von DNA-Fragmenten in bakterielle Plasmidvektoren	55
2.5.2.1	Ligation in pCR®2.1TOPO-Vektor	56
2.5.2.2	Ligation in pGEM®T-Vektor	56
2.5.2.3	Transformation elektrokompenter Zellen	57
2.5.2.4	Transformation chemisch kompetenter Zellen	57
2.5.2.5	Selektion transformierter Klone	58
2.5.3	Plasmidisolierung	59
2.5.4	Analyse und Weiterverarbeitung des isolierten Plasmids	60
2.5.4.1	Plasmid-Analyse durch <i>Insert</i> -PCR	60
2.5.4.2	Plasmid-Linearisierung durch Restriktionsendonucleasen	61
2.6	Immunhistochemie	62
2.6.1	Vorbehandlung der Gewebeschnitte	62
2.6.2	Primärantikörper	62
2.6.2.1	Peroxidase-Färbung	63
2.6.2.2	Doppelfluoreszenzmarkierung	64
2.6.3	Tyramid-Signalamplifikation	64
2.6.3.1	Funktionsprinzip	65
2.6.3.2	Anwendung	65
2.6.4	Markierung neuromuskulärer Endplatten mit α -Bungarotoxin	66
2.6.5	Qualitative Auswertung	67
2.6.5.1	Immun-Peroxidase-Färbungen	67
2.6.5.2	Doppelfluoreszenzen	67
2.6.6	Quantitative Auswertung und statistische Analyse	68
2.6.6.1	Motorneurone	69
2.6.6.2	Astroglia	69
2.6.6.3	Mikroglia	70
2.6.6.4	Lymphozyten	70
2.7	<i>In situ</i>-Hybridisierung (ISH)	71
2.7.1	Ermittlung optimaler Primersequenzen	72
2.7.2	Herstellung einer DNA-Matrize	73
2.7.3	Synthese von mRNA-Sonden durch <i>in vitro</i> -Transkription	73
2.7.3.1	Synthese einer radioaktiv-markierten Ribosonde	74
2.7.3.2	Synthese einer DIG-markierten Ribosonde	75
2.7.4	Hybridisierungsverfahren	76

2.7.4.1	Prähybridisierung	76
2.7.4.2	Hybridisierung.....	77
2.7.4.3	Posthybridisierung.....	77
2.7.5	Detektion der Ribosonden	77
2.7.5.1	Detektion der Radioaktivsignale durch Röntgenfilm-Autoradiogramme	77
2.7.5.2	Detektion der Radioaktivsignale durch Gewebe-Autoradiogramme	78
2.7.5.3	Immunologische Detektion der DIG-Signale durch Chromogenreaktion.....	78
2.7.6	Kombination zweier unterschiedlich markierter Ribosonden	79
2.7.7	Qualitative Auswertung der <i>in situ</i> -Hybridisierungen:	79
2.7.8	Kombination der <i>in situ</i> -Hybridisierung mit einer Immunhistochemie	80
2.7.8.1	Integration und Veränderung der IHC- und ISH-Protokolle.....	80
2.7.8.2	Qualitative Beurteilung der kombinierten Signale	81
2.8	Puffer und Lösungen.....	82
2.9	Herstellerangaben	85
2.9.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	85
2.9.2	Geräte	86
2.9.3	Software	87
3	Ergebnisse.....	88
3.1	Calcitonin-gene related peptide	88
3.1.1	Effekte einer α CGRP-Deletion auf den Krankheitsverlauf der ALS	88
3.1.2	Zeitverlauf der Veränderung der CGRP-Immunoreaktivität im Gehirn	90
3.1.2.1	CGRP-Immunoreaktivität in somatomotorischen Arealen des Hirnstamms	90
3.1.2.2	CGRP-Immunoreaktivität in nicht-somatomotorischen Arealen.....	92
3.1.3	CGRP-Expression als Unterscheidungskriterium für vulnerable und resistente Motoneurone	95
3.1.3.1	Definition drei verschiedener Motoneuronen-Typen anhand ihrer CGRP-Expression	95
3.1.3.2	Gruppierung der motorischen Nuclei anhand des relativen Gehalts verschiedener Motoneuronentypen.....	95
3.1.3.3	Die Motoneuronentypen definieren sich maßgeblich durch ihren Gehalt an α CGRP.....	97
3.1.3.4	Die Vulnerabilität einer Nuclei-Gruppe korreliert mit derjenigen des dominanten Motoneuronentyps.....	101
3.1.3.5	Zeitverlauf der Degeneration von <i>high</i> CGRP- und <i>low</i> CGRP-Motoneuronen	105
3.1.4	Expressionsmuster der CGRP-Rezeptorkomplexe.....	105
3.1.4.1	CRLR-Immunoreaktivität in Astrozyten.....	106
3.1.4.2	Etablierung von Ribosonden für CRLR und RAMP1-3	107
3.1.4.3	Expression von CRLR und RAMP1-3 in ALS-relevanten Hirnarealen und Zelltypen	109
3.1.5	Etablierung von Testverfahren für Griffstärke der Vorderpfote und die Zungenmotorik und Untersuchung von Geschlechtsunterschieden im Krankheitsverlauf der ALS	112
3.1.5.1	Definition der Schwellenwerte von Griffstärke und Leckfrequenz	112
3.1.5.2	Geschlechtsunterschiede im Krankheitsverlauf der ALS.....	114
3.1.6	Effekte einer RAMP1-Deletion auf den Krankheitsverlauf der ALS	117
3.1.6.1	Auswirkungen auf den Verlauf der klinischen Symptomatik	117
3.1.6.2	Auswirkungen auf Neurodegeneration und Neuroinflammation	120
3.1.6.3	Auswirkungen auf die Denervierung neuromuskulärer Endplatten	126
3.2	Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide	130
3.2.1	Expressionsprofil von PACAP und seiner Rezeptoren im Wildtyp.....	130
3.2.1.1	<i>In situ</i> -Hybridisierung	130
3.2.1.2	PCR an isolierten Zelltypen	132
3.2.2	Veränderung der PACAP-Expression im SOD1-Mausmodell	133
3.2.3	Effekte einer PACAP-Defizienz auf den Krankheitsverlauf der ALS	137
3.2.3.1	Auswirkungen auf den Verlauf der klinischen Symptomatik	137
3.2.3.2	Auswirkungen auf Neurodegeneration und Neuroinflammation	141
3.2.3.3	Unterschiede in der Mikroglia-Morphologie	144

4	Diskussion	146
4.1	Calcitonin gene-related Peptide	146
4.1.1	Veränderungen der CGRP-Immunoreaktivität im Gehirn	147
4.1.1.1	Charakteristik der Vakuolisierung und ihre Relevanz in der ALS-Pathogenese ..	147
4.1.1.2	Assoziation der CGRP-Vakuolen mit Astrozyten	151
4.1.2	Die Rolle von CGRP im Krankheitsverlauf der ALS	151
4.1.2.1	CGRP als Markerprotein für die Vulnerabilität der Motoneuronen	151
4.1.2.2	CGRP als Signal neuronaler Schädigung	155
4.1.2.3	CGRP als Modulator der Neuroinflammation	156
4.1.2.4	CGRP als Signalmolekül an der Muskelfaser	159
4.1.3	Therapeutisches Potential von CGRP-Antagonisten in der ALS	160
4.2	Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide	162
4.2.1	Veränderung der PACAP-Expression als Reaktion auf neuronale Schädigung	162
4.2.2	Verzögerung des Krankheitsverlaufes SOD1-transgener Tiere durch PACAP-Deletion	163
4.2.3	Auswirkungen der PACAP-Deletion auf die Motoneuronendegeneration	163
4.2.4	Auswirkungen der PACAP-Deletion auf die Neuroinflammation	164
4.2.5	Die Rolle von endogenem PACAP in der ALS-Pathologie	166
4.2.6	Therapeutisches Potential von PACAP-Agonisten und –Antagonisten in der ALS	166
4.3	Mögliche Beteiligung anderer Neuropeptide	167
4.4	Fazit	167
5	Anhang	169
5.1	Literaturverzeichnis	169
5.2	Datensätze	183
5.2.1	Effekt der αCGRP-Deletion im SOD1-Mausmodell	183
5.2.2	Quantifizierung Motoneurontypen	183
5.2.3	Untersuchung von Geschlechtsunterschieden im SOD1 Mausmodell	184
5.2.4	Effekt der RAMP1-Deletion im SOD1-Mausmodell	185
5.2.4.1	Dokumentation der klinischen Symptomatik	185
5.2.4.2	Quantifizierung von Neurodegeneration und Neuroinflammation	187
5.2.4.3	Quantifizierung Innervationsstatus	188
5.2.5	Effekt der PACAP-Deletion im SOD1-Mausmodell	189
5.2.5.1	Dokumentation der klinischen Symptomatik	189
5.2.5.2	Quantifizierung von Neurodegeneration und Neuroinflammation	191
5.3	Abkürzungsverzeichnis	192
	Curriculum Vitae	194
	Verzeichnis der akademischen Lehrer	198
	Ehrenwörtliche Erklärung	199
	Danksagung	200

Zusammenfassung

Bei der amyotrophen Lateralsklerose (ALS) handelt es sich um eine tödlich verlaufende, neurodegenerative Erkrankung, für die bisher keine effektiven Therapiemöglichkeiten zur Verfügung stehen. Gekennzeichnet ist die ALS durch den Verlust der Motoneurone, der zur Denervierung der Muskulatur und letztendlich dem Tod durch Atemlähmung führt. Die molekularen Ursachen der ALS sind vielfältig und bis heute nur unzureichend aufgeklärt, aktuell stehen die Rolle der begleitenden Neuroinflammation und die molekularen Unterschiede zwischen ALS-vulnerablen und ALS-resistenten Motoneuronen im Zentrum der Forschung. Obwohl der neuroprotektive Einfluss verschiedener Neuropeptide in anderen neurodegenerativen Erkrankungen, Ischämie oder Axotomie lange bekannt ist, wurde deren Rolle bei der ALS bisher kaum untersucht. In der vorliegenden Arbeit sollte die Beteiligung der aussichtsreichsten Kandidaten *Calcitonin gene-related Peptide* (CGRP) und *Pituitary adenylate cyclase-activating Polypeptide* (PACAP) am Krankheitsverlauf des SOD1^{G93A}-Mausmodells der ALS aufgeklärt werden.

Im Gegensatz zu Axotomie oder peripherer Inflammation war in somatomotorischen Neuronen keine Hochregulation der CGRP-Expression in ALS-kranken Mäusen zu beobachten. Doch traten beginnend am postnatalen Tag (P) 40 CGRP-immunoreaktive Vakuolen in den Neuriten auf, die im Zeitverlauf deutlich an Volumen zunahmen und nach der Degeneration der Motoneurone frei im Neuropil vorlagen. Diese Veränderung der CGRP-Immunoreaktivität ging dem Einsetzen der klinischen Symptomatik an P90-100 deutlich voraus und war räumlich und zeitlich eng mit einer Aktivierung der Astrozyten assoziiert. Zudem traten die Vakuolen, ebenfalls beginnend an P40, in extramotorischen Arealen wie dem Hypothalamus und der Substantia nigra auf. Da auch bei ALS-Patienten Störungen nigraler und extramotorischer Funktionen beobachtet werden, ist diese Beobachtung im Mausmodell ein wichtiger Hinweis darauf, dass es sich bei der ALS nicht ausschließlich um eine Motoneuronen-, sondern eine Multisystemerkrankung mit unterschiedlichen Subtypen handeln könnte. Desweiteren wurde mit CGRP erstmalig ein Biomarker für vulnerable Motoneurone identifiziert. So konnte gezeigt werden, dass es einerseits Motoneurone ohne CGRP-Expression (*nonCGRP*) gibt und diese gegen die ALS-Pathologie resistent zu sein scheinen, während andererseits Motoneurone mit starker oder schwacher CGRP-Expression (*high* und *lowCGRP*) im Zeitverlauf der Erkrankung selektiv degenerieren, und zwar umso früher und umso stärker, je mehr CGRP sie exprimieren. Die bisher vorgenommene Abgrenzung der resistenten, oculomotorischen Nuclei von den vulnerablen motorischen Nuclei im Hirnstamm resultiert eben-

falls aus der CGRP-Expression, da nachgewiesen werden konnte, dass sich die oculomotorischen Kerne in der Mehrheit aus *non*CGRP-Neuronen zusammensetzen, während stark vulnerable Kerne wie der Nucleus ambiguus hauptsächlich aus *high*CGRP-Motoneuronen bestehen. Während eine Deletion von α CGRP keinen Effekt auf den Krankheitsverlauf des SOD1^{G93A}-Mausmodell hatte, resultierte die Deletion der CGRP-spezifischen Rezeptorkomponente *Receptor activity modifying protein 1* (RAMP1) in einem früheren motorischen Krankheitsbeginn mit einem anschließend verlangsamten Verlauf der Symptomatik. Histopathologisch waren diese Veränderungen mit einer reduzierten Neuroinflammation, insbesondere einer geringeren Aktivierung der Astrozyten und einem Ausbleiben der Lymphozyteninfiltration assoziiert. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass CGRP in der ALS-Pathologie einen stimulierenden Einfluss auf die Neuroinflammation hat und diese zu Beginn der Erkrankung einen protektiven, später einen toxischen Effekt auf die Motoneurone ausübt. Im bereits erkrankten Patienten könnte der therapeutische Einsatz von CGRP-Antagonisten ebenfalls einen hemmenden Einfluss auf die neurotoxischen Komponenten der Neuroinflammation ausüben und somit die Krankheitsprogression verlangsamen.

Während Motoneurone auf Axotomie mit einer starken Induktion der PACAP-Expression reagieren, war im Zuge der hier untersuchten ALS-Pathologie nur in wenigen Einzelneuronen eine Induktion des Neuropeptids zu beobachten. In früheren Studien an anderen neuronalen Erkrankungen bzw. Schädigungen wie Morbus Parkinson und Alzheimer, Ischämie oder Axotomie hatte PACAP grundsätzlich eine neuroprotektive Wirkung, ein Unterbinden der Signalkaskade sollte also in einem progressiveren Krankheitsverlauf resultieren. Entgegen dieser Erwartung verlängerte sich bei der Einkreuzung einer PACAP-Defizienz in das SOD1^{G93A}-Mausmodell die durchschnittliche Lebenserwartung der Tiere jedoch um ca. 5,5%. Im Gegensatz zu anderen neurodegenerativen Erkrankungen scheint PACAP in der ALS also keinen protektiven Effekt auszuüben, sondern die Pathogenese zu beschleunigen. Histopathologisch war im Endstadium SOD1^{G94A}-transgener Tiere unter der PACAP-Deletion eine amöbiode Morphologie der Mikroglia zu beobachten, während PACAP-kompetente Tiere bereits hypertrophe und degenerierende Mikroglia aufwiesen. Dies deutete auf eine geringere oder verzögerte Aktivierung der Mikroglia in PACAP-defizienten Tieren hin. Die damit einhergehende Reduktion der neurotoxischen Wirkung der Neuroinflammation könnte die Verzögerung des Krankheitsverlaufs erklären. Entsprechend besitzt auch im Falle von PACAP der Einsatz von Antagonisten ein therapeutisches Potential bezüglich einer Hemmung der Krankheitsprogression in der ALS-Pathogenese.

Summary

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is an adult-onset, neurodegenerative disease characterised by the selective loss of upper and lower motor neurones, resulting in progressive paralysis and death due to respiratory failure. Up to date no effective cure is available and the multifaceted molecular causes are poorly understood. In this context, two aspects are of special interest: first, the participation of neuroinflammatory processes in the genesis and progression of the disease and, second, molecular differences between motor neurons which are vulnerable or resistant to disease pathology, respectively.

While the neuroprotective properties of various neuropeptides are well studied in Parkinson's and Alzheimer's disease as well as in ischemia and axotomy, but their role in ALS is not known. Therefore, the present study investigates the involvement of the two most promising candidates *Calcitonin gene-related Peptide* (CGRP) and *Pituitary adenylate cyclase-activating Polypeptide* (PACAP) in the pathogenesis of the SOD1^{G93A} mouse model of ALS.

During ALS pathology no up-regulation of CGRP expression was observed in motor neurons of SOD1 transgenic mice. Instead, CGRP-immunoreactive vacuoles occurred in the neurites of brain stem motor neurons, starting at postnatal day (P) 40 and increasing in diameter with age. After degeneration of the motor neuron they become freely localized in the neuropil without any assignment to a cell type or compartment. These changes in CGRP-immunoreactivity clearly preceded the onset of clinical symptoms at P90-100 and showed a close spatiotemporal association with the activation of astroglia. Additionally, starting at P40 as well, CGRP-positive vacuoles appeared in other brain areas, e.g. hypothalamus and substantia nigra. Because some ALS patients show nigral or extra motoric deficits as well, these findings within the SOD1 mouse model are an additional strong hint for ALS being a multisystem disorder with different subtypes rather than a motor neuron specific disease.

Furthermore, CGRP was identified as the first molecular biomarker for vulnerable motor neurones. Three different types of motor neurones were defined based on their CGRP expression level: neurons with high or low expression levels (*high* and *low*CGRP), respectively, and neurons without CGRP expression (*non*CGRP). *Non*CGRP motor neurons were found to be ALS resistant, whereas CGRP-expressing motor neurones were vulnerable, in a way that the higher their CGRP expression, the more prone to degenerate they were. The hitherto existing separation of the resistant, extra ocular motor nuclei from other vulnerable motor nuclei in the brain stem also was based on CGRP expression. As an example, the oculomotor nucleus

nearly exclusively consists of resistant *non*CGRP motor neurons, whereas the highly vulnerable ambiguous nucleus is mostly build up by *high*CGRP motor neurons.

Whereas a deletion of α CGRP had no effect on the time course of the disease in SOD1^{G93A} mice, a deletion of the CGRP specific receptor component *receptor affinity modifying protein 1* (RAMP1) resulted in an earlier onset of the motor dysfunctions, followed by a deceleration of disease progression. On the histological level, these changes were associated with a reduced neuroinflammation, most notably the absence of lymphocyte infiltration and a reduced astroglial activation. Therefore, the functional role of CGRP in ALS may be to activate and drive neuroinflammation and to stimulate lymphocyte infiltration into the brain parenchyma. Given the earlier disease onset but slower progression in RAMP1-deficient mice with lower extent of neuroinflammation, one could conclude that the neuroinflammation itself has a neuroprotective impact in early disease stages whereas in later stages, the effect changes to neurotoxic characteristics. Thus, in the already diseased ALS patient, application of CGRP antagonist may be a potent therapeutic strategy to reduce toxic components of the neuroinflammation and thereby slowing disease progression.

PACAP was found not to be expressed to a significant extent in wildtype motor neurons. An induction of PACAP gene expression was only observed in a few single motor neurons in the ALS model studied here. But, in spite of these minimal changes, a depletion of PACAP in SOD1G93A mice resulted in an extension of life time of about 5,5%. Thus, in contrast to neurodegenerative disorders like Alzheimer's and Parkinson's disease or neuronal damage during axotomy or ischemia, PACAP seems to play a neurodestructive role during ALS pathology. On the histological level, a change in microglial number and morphology was observed, suggesting a different degree or later onset of activation in PACAP-deficient mice. This, in turn, may result in a reduction of the neurotoxic effects of the neuroinflammation in the late stage of the disease. Therefore, the use of antagonists against PACAP may exert some therapeutic potential as well.

1 Einleitung

1.1 Die amyotrophe Lateralsklerose

Bei der amyotrophen Lateralsklerose (ALS) handelt es sich um eine neurodegenerative Krankheit, die sich klinisch durch einen fortschreitenden Verlust der Willkürmotorik manifestiert. Ursache dafür ist der Untergang der die Skelettmuskulatur innervierenden Motoneurone in Rückenmark und Gehirn, weshalb die ALS im englischen Sprachraum auch unter *Motor Neuron Disease* (MND) bekannt ist. Der Begriff „Lateralsklerose“ erklärt sich durch die Beobachtung des Erstbeschreibers Jean-Martin Charcot (1898), der im postmortalen Rückenmarksgewebe von ALS-Patienten seitliche Verhärtungen entdeckte, die sich auf die Degeneration der corticospinalen Projektionsbahnen mit anschließender Vernarbung zurückführen lassen.

Mit einer Inzidenz (Anzahl Neuerkrankungen pro Jahr) von 2-3/100.000 (Roman, 1996, Kiernan et al., 2011) ist die ALS eine relativ seltene Krankheit. Sie zählt neben Alzheimer, Parkinson, Multipler Sklerose und Chorea Huntington aber trotzdem zu den häufigsten neurodegenerativen Krankheiten, unter denen sie durch ihre nur unvollständig bekannten molekularen Ursachen, den progressiven und grundsätzlich tödlichen Verlauf sowie das Fehlen wirksamer Therapiemöglichkeiten auffällt.

1.1.1 Symptomatik und Ätiologie beim Menschen

Die ALS ist charakterisiert durch den selektiven Verlust an primären und sekundären Motoneuronen in Rückenmark, Hirnstamm und Kortex, was sich in einem Innervationsverlust und daraus folgender Muskelschwäche bis hin zur Lähmung äußert. Der Verlust der motorischen Kontrolle geht dabei ohne Beeinträchtigung sensorischer oder sensibler Funktionen einher und auch die viszeromotorische Innervation der glatten Muskulatur ist weitgehend unbeeinträchtigt. Gewöhnlich tritt initial eine Muskelschwäche in den Extremitäten (spinale Formen, 70%) oder der Gesichtsmuskulatur (bulbäre Formen, 30%) auf, woraufhin ein progressives Fortschreiten der Lähmungserscheinungen zu beobachten ist, die durchschnittlich 3-5 Jahre nach Diagnosestellung zum Tod durch Atemlähmung führen. Die mit Sprech- und Schluckbeschwerden beginnenden bulbären Formen zeigen mit einer Lebenserwartung von 1-3 Jahren nach Diagnose meist einen aggressiveren Verlauf als die spinalen Formen mit einem Beginn der Lähmung in den (meist unteren) Extremitäten und einer Lebenserwartung von 4-6 Jahren.

Selten treten auch weniger progressive Krankheitsverläufe auf, bei denen die Patienten mehrere Jahrzehnte überleben können. Der durchschnittliche Beginn der Krankheit liegt bei 55 Jahren, doch sind auch wesentlich früher beginnende, juvenile Formen bekannt, die eine günstigere Prognose haben als spät einsetzende Erkrankungen.

Bis heute gibt es keine wirksamen Therapiemöglichkeiten, lediglich die Gabe des Glutamat-Inhibitors Riluzole verlängert die durchschnittliche Überlebensdauer um 3-5 Monate. Ein weiteres Problem ist das Fehlen eines Biomarkers, über den sich die ALS schneller von anderen Erkrankungen mit ähnlicher Symptomatik differenzieren ließe. Letzteres wäre für das frühestmögliche Ergreifen therapeutischer Maßnahmen, sowohl auf medizinischer, als auch psychosozialer Ebene äußerst wünschenswert. Für eine detaillierte Übersicht zu Diagnose, Prognose und Behandlung siehe Kiernan et al. (2011) oder Eisen (2009).

1.1.2 Ursachen der ALS

In der großen Mehrheit kommt es zu einer spontanen Erkrankung (sporadische ALS, sALS), mit unbekannter Ursache, doch tritt bei 5-10% der Fälle ein familiäres Erscheinen der Krankheit (familiäre ALS, fALS) mit einer meist autosomal-dominanten, in wenigen Ausnahmen rezessiven Vererbung nach Mendel auf. Bis heute wurden 9 Proteine und einige weitere Genloci bisher unbekannter Funktion entdeckt, deren Mutation zur Ausbildung verschiedener Formen der FALS führen und welche teilweise auch in der SALS auftreten (siehe Tabelle 1.1.1.). Mit 20% der fALS und 5% der sALS sind Mutationen der Kupfer/Zink-Superoxiddismutase (SOD1, entspricht ca. 2% aller ALS-Fälle) am häufigsten. Einen weiteren großen Anteil stellen die erst vor kurzem entdeckten TDP-43 und FUS mit je ca. 5%. Für eine detaillierte Übersicht zur Beteiligung anderer Gene siehe Van Damme and Robberecht (2009) oder Bento-Abreu et al. (2010).

Tabelle 1.1.1.: An der ALS beteiligte Gene

Bezeichnung	Gen	Chromosom	Erbgang	Krankheitsbeginn	TDP-43 neuropathy	Auftreten FTL
ALS1	<i>SOD1</i>	21q	Autosomal dominant (autosomal recessive)	Adult	-/+	(+)
ALS2	<i>Alsin</i>	2q	Autosomal recessive	Childhood	?	-
ALS3	?	18q	Autosomal dominant	Adult	?	-
ALS4	<i>Senataxin</i>	9q	Autosomal dominant	Childhood and adolescent	?	-
ALS5	?	15q	Autosomal recessive	Childhood	?	-
ALS6	<i>FUS/TLS</i>	16p	Autosomal dominant (autosomal recessive)	Adult	-	-
ALS7	?	20p	Autosomal dominant	Adult	?	-
ALS8	<i>VAPB</i>	20q	Autosomal dominant	Adult	?	-
ALS9	<i>Angiogenin</i>	14q	Autosomal dominant	Adult	+	+
ALS10	<i>TDP-43</i>	1p	Autosomal dominant	Adult	+	+
ALS11	<i>FIG4</i>	6q	Autosomal dominant	Adult	?	-
ALS-FTD1	?	9q	Autosomal dominant	Adult	?	+
ALS-FTD2	?	9p	Autosomal dominant	Adult	+	+
ALS-FTD3	<i>CHMP2B</i>	2p	?	Adult	-	+

CHMP2B, charged multivesicular body protein 2B; FIG4, factor-induced gene 4 protein; FTL, frontotemporal lobar degeneration; FUS/TLS, fused in sarcoma/translocated in liposarcoma; SOD1, superoxide dismutase 1; TDP-43, transactive response DNA-binding protein 43; VAPB, vesicle-associated membrane protein B.

Aufgrund ihrer Relevanz für die familiäre sowie die sporadische ALS stehen Mutationen der SOD1 und von TDP-43/FUS aktuell im Zentrum der Forschung. Erstere vor allem aufgrund vieler etablierter Tiermodelle (Julien and Kriz, 2006), die zur besseren Erforschung der Krankheitsursachen und möglicher Therapiemöglichkeiten dienen, letztere wegen ihrer Assoziation mit der frontotemporalen Demenz (FTD), die neue Erkenntnisse zur molekularen Ursache beider Erkrankungen eröffnet (Mackenzie et al., 2010, Giordana et al., 2011).

Die molekularen Grundlagen von Entstehung und Progression der selektiven Degeneration der Motoneurone, vor allem im Falle von Mutationen ubiquitär exprimierter Proteine wie der SOD1, sind vielfältig und nur unzureichend geklärt. Als mögliche Ursachen werden aktuell Defekte des axonalen Transports, Proteinaggregationen mit resultierenden Defekten in Proteinfunktionen und -abbau, Mitochondriopathien, Erregungstoxizität und oxidativer Stress diskutiert (siehe 1.1.3); für die Progression wird vor allem die mit der Degeneration der Motoneurone einhergehende Neuroinflammation verantwortlich gemacht (siehe 1.3.4). Zu bemerken ist allerdings, dass nicht alle Motoneurone gegenüber der ALS vulnerabel sind: die die Augenmuskeln innervierenden Motoneurone des Nervus (N.) bzw. Nucleus (Ncl.) oculomotorius, N./Ncl. abducens und N./Ncl. trochlearis im Hirnstamm sowie die den Blasensphincter innervierenden Motoneurone im lumbalen/sacralen Rückenmark degenerieren sowohl beim Menschen als auch der Maus selbst in fortgeschrittenen Krankheitsstadien nicht, scheinen also ALS-resistent zu sein (Ohki et al., 1994, Haenggeli and Kato, 2002).

Während starke körperliche Belastung inzwischen als Risikofaktor feststeht (Chio et al., 2008, Harwood et al., 2009) ist noch immer unklar, in wie weit auch Umweltfaktoren wie Gifte eine Rolle spielen.

1.1.3 Molekulare Mechanismen der Motoneuronendegeneration

Als mögliche Ursachen des selektiven Verlusts der Motoneurone werden vor allem drei zentrale Mechanismen diskutiert, die sich gegenseitig bedingen und entsprechend sowohl ursächlich als auch als Folgeerscheinung an der ALS-Pathologie beteiligt sein können (siehe Abb. 1.1.1.). Es handelt sich dabei zum einen um oxidativen Stress, der durch verschiedene Ursachen (Mitochondriopathien, Erregungstoxizität, mutierte SOD1) ausgelöst werden kann und zur Zellschädigung führt. Zum anderen gewinnt eine ursächliche Beteiligung der Glia als Produzent inflammatorischer und toxischer Substanzen immer mehr an Bedeutung, während die Entstehung von Proteinaggregationen (z.B. TDP-43 und SOD1) mit daraus resultierenden Defekten im axonalen Transport und der Überladung des Proteasoms vermutlich eher sekundäre Folgen statt Ursachen der ALS-Pathologie darstellen.

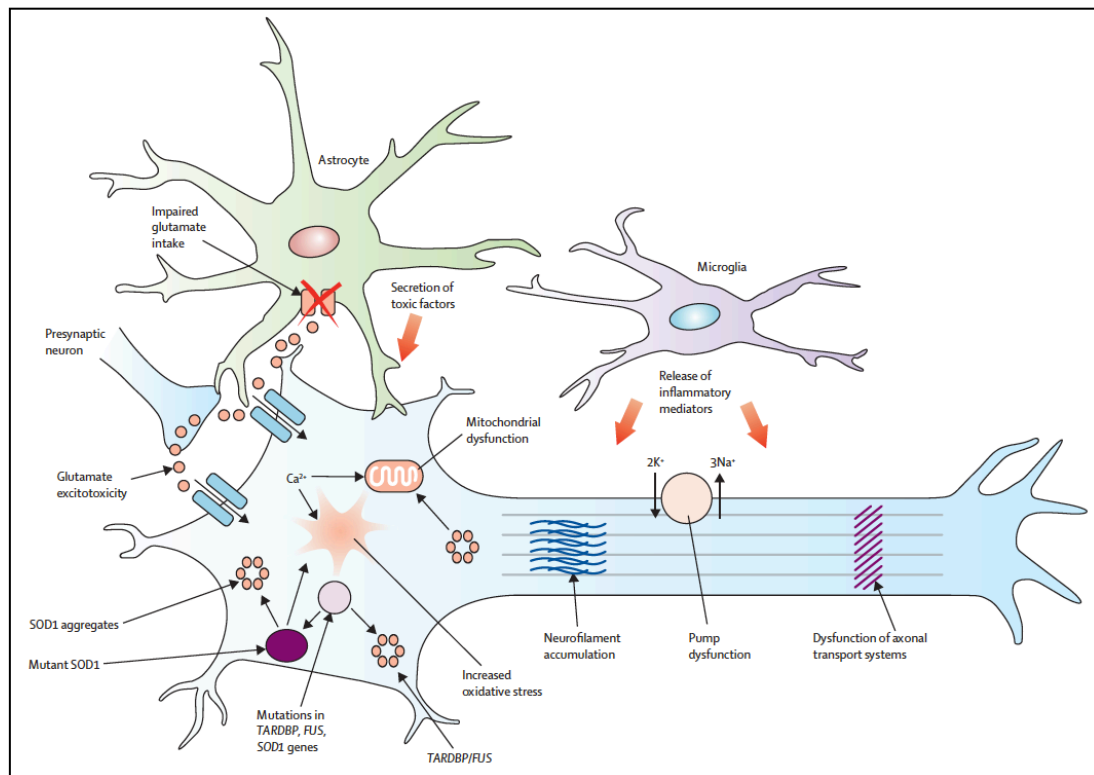


Abb. 1.1.1.: Zelluläre und molekulare Mechanismen der Neurodegeneration in der ALS. Die an der Degeneration der Motoneurone beteiligten Mechanismen sind multifaktoriell und entstehen aus einem komplexen Zusammenspiel genetischer Prädispositionen und anderer, auch umweltbedingter Risikofaktoren. Auf der zellulär-molekularen Ebene resultiert die Neurodegeneration vermutlich aus einer Interaktion zwischen Erregungstoxizität, oxidativem Stress, Proteinaggregationen aus mutierten Proteinen wie SOD1, TDP-43 oder Neurofilamenten mit daraus resultierenden Defekten der Proteasom-Ubiquitin-Degradation und des axonalen Transports. Außerdem kommt es zu einer Fehlfunktion der Mitochondrien sowie zur Ausschüttung toxischer Faktoren durch aktivierte Mikroglia und Astrozyten, die beide apoptotische Signalwege in den Motoneuronen auslösen. Aus: Kiernan et al. (2011).

Die für diese Arbeit relevanten Mechanismen sind im folgenden beschrieben, für ausführlichere Informationen zu anderen Aspekten wie Defekten im axonalen Transport, der Überladung des Proteasoms, TDP-43/FUS etc. siehe Rothstein (2009), Van Damme and Robberecht (2009) oder Bento-Abreu et al. (2010).

1.1.3.1 SOD1-Mutationen

Bei der weitgehend zytoplasmatisch vorliegenden SOD1 handelt es sich um ein hoch konserviertes Enzym von 32kDa Größe, das von allen Eukaryoten ubiquitär exprimiert wird. Durch die zur Funktion notwendigen Cofaktoren (ein Kupfer- und ein Zink-Ion) wird sie auch Kupfer/Zink-Superoxiddismutase (Cu/ZnSOD) genannt und damit von der strukturell nicht verwandten und ausschließlich mitochondrial lokalisierten Mangan-Superoxiddismutase (MnSOD, SOD2) unterschieden. In physiologischem Zustand liegt die SOD1 als Homodimer vor (siehe Abb. 1.1.2) und dient dem Abbau reaktiver Superoxid-Radikale ($O_2^{\cdot-}$) in Sauerstoff

(O₂) und Wasserstoffperoxid (H₂O₂). Neben einer Disulfidbrücke dient auch das Zink-Ion der Stabilisierung der Proteinstruktur, insbesondere der Bindungsstelle des katalytischen Kupfer-Ions, das entscheidend für die enzymatische Funktion der SOD1 ist und meist durch das Chaperon CCS (*copper chaperone for SOD1*) inseriert wird (Field et al., 2002, Perry et al., 2010).

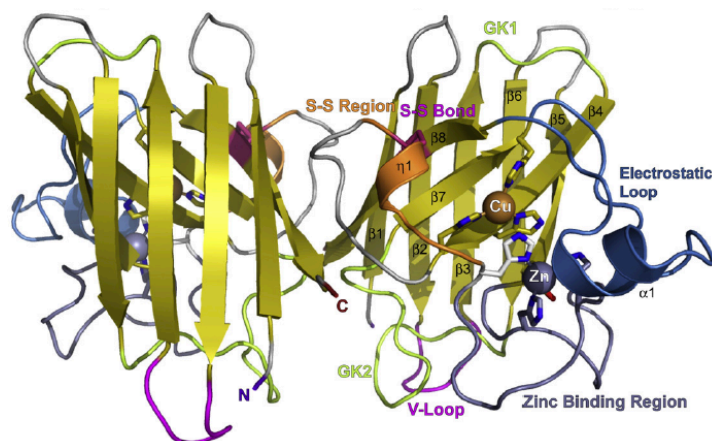


Abbildung 1.1.2.: Proteinstruktur eines SOD1-Homodimers. Strukturell gehört die SOD1 zur Familie der Immunglobuline und entspricht dabei dem klassischen Aufbau aus einem achtsträngigen β -Faltblatt (gelb) und mehreren Proteinschleifen. Eine elektrostatische Kanalschleife (blau), bildet den positiv geladenen Eingang zum aktiven Zentrum, eine metallbindende Schleife (grau) koordiniert das Kupfer- (Cu) und ein Zink-Ion (Zn), zwei Dimerisierungsschleifen (grün und braun) stellen über eine Disulfidbrücke (S-S) den Kontakt zur zweiten Untereinheit des Homodimers her. Aus: Perry et al. (2010).

Seit der Entdeckung einer SOD1-Mutation als Ursache der familiären ALS (Rosen, 1993) sind weit über hundert weitere Mutationen der SOD1 bekannt, die mit der FALS assoziiert sind (aktueller Stand: 165, nachzulesen unter www.alsod.org). Dabei handelt es sich meist um *missense*-Mutationen innerhalb der codierenden Sequenz, die zum Austausch einer einzelnen Aminosäure innerhalb des Proteins führen. Solche Austausche finden sich über die gesamte Aminosäure-Sequenz des Proteins hinweg, wobei sich die resultierenden Phänotypen der ALS nur wenig unterscheiden. Ein einfacher Funktionsverlust der SOD1 kommt als Krankheitsursache jedoch nicht in Frage, da eine SOD1-Knockout-Maus keine ALS-ähnlichen Symptome zeigt (Reaume et al., 1996) und viele mutierte SOD1-Enzyme keine Veränderungen der enzymatischen Aktivität zeigen (Perry et al., 2010). Eine alternative Erklärung für die Toxizität ist, dass die Mutationen die Konformation der SOD1 verändern, so dass diese zur Aggregatbildung neigt und sich in der Zelle ablagert. Solche Proteinaggregationen wurden im Fall der SOD1 sowohl bei Patienten der FALS und SALS als auch in verschiedenen Mausmodellen gefunden (Bruijn et al., 1998, Cleveland and Liu, 2000, Watanabe et al., 2001), treten aber auch bei Mutationen des TDP-43 (Xu et al., 2010, Yang et al., 2010, Che et al., 2011) und der Neurofilamente wie Peripherin auf (siehe Xiao et al., 2006). Im Fall der β Amyloid-Plaques bei Alzheimer beziehungsweise der Lewy-Bodys bei Parkinson (Fornai et al., 2003, Nakamura and Lipton, 2010, Ballard et al., 2011, Ittner and Gotz, 2011) werden solche Proteinaggregationen als mögliche Ursachen der Neurodegeneration diskutiert. Als Folge der

Akkumulation dieser Aggregate in der Zelle werden auch andere Proteine, Enzyme und Organellen in ihrer Funktion beeinträchtigt sowie der Ubiquitin-Proteasom-Weg gehemmt oder gar blockiert (Rothstein, 2009).

Da eine Mutation der SOD1 beim Menschen ausreichend ist, um zur Ausbildung des Krankheitsbildes zu führen (aufgrund des dominanten Erbgangs selbst bei nur einem betroffenen Allel, siehe 1.1.1), wurden zur weiteren Erforschung der Krankheitsursachen, ihrer Symptome und eventueller Therapieansätze mehrere Mausmodelle etabliert, die auf unterschiedlichen Mutationen der SOD1 beruhen. Beispiele dafür sind die Varianten G37R, G85R und G93A, wobei die Mäuse zusätzlich zu ihrer eigenen Wildtyp-SOD1 eine mutierte SOD1 humanen Ursprungs exprimieren und als Folge eine Symptomatik zeigen, die der menschlichen ALS-Erkrankung entspricht. In Abhängigkeit von der Kopienzahl treten jedoch Unterschiede bezüglich des Krankheitsbeginns, des zeitlichen Verlaufs der klinischen Symptome und der Lebenserwartung auf, wobei eine höhere Kopienzahl in einem früherem Beginn und progressiverem Verlauf der Erkrankung resultiert. Bei dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Tiermodell handelt es sich um die Variante SOD1^{G93A} in hoher Kopienzahl (haploid ca. 25, Gurney, 1994). Die Tiere zeigen hier um den postnatalen Tag 90 (P90) die ersten motorischen Symptome und weisen eine Lebensdauer von 120-140 Tagen auf.

1.1.3.2 Mitochondriopathien

Autopsiegewebe von ALS-Patienten weisen Aggregate abnormal geformter Mitochondrien in Muskeln (Afifi et al., 1966), proximalen Axonen (Hirano et al., 1984) und Motoneuronen (Sasaki and Iwata, 1996) sowie pathologische Veränderungen in Form einer Vakuolisierung auf, die sich auch in SOD1^{G93A}- und SOD1^{G37R}-basierten Mausmodellen finden (Dal Canto and Gurney, 1994). Entsprechend scheint eine pathologische Veränderung dieses Zellorgans eine zentrale Rolle in der Ätiologie der ALS zu spielen, vor allem da zu Beginn der Erkrankung, der sich symptomatisch durch deutliche Verminderung der Muskelkraft bei noch relativ geringem Verlust an Motoneuronen äußert, bereits ein massiver Anstieg an vakuolisierten Mitochondrien in den Axonen der Motoneurone zu beobachten ist (Kong and Xu, 1998).

Es ist also anzunehmen, dass die pathologische Veränderung von Mitochondrien ein sehr frühes Stadium der Krankheitsentwicklung darstellt, wenn nicht gar ursächlich an ihrer Entstehung beteiligt ist, wofür mehrere Mechanismen in Frage kommen, die aus Dysfunktionen verschiedener mitochondrialer Aufgaben resultieren können (siehe detaillierte Übersicht in Kawamata and Manfredi, 2010).

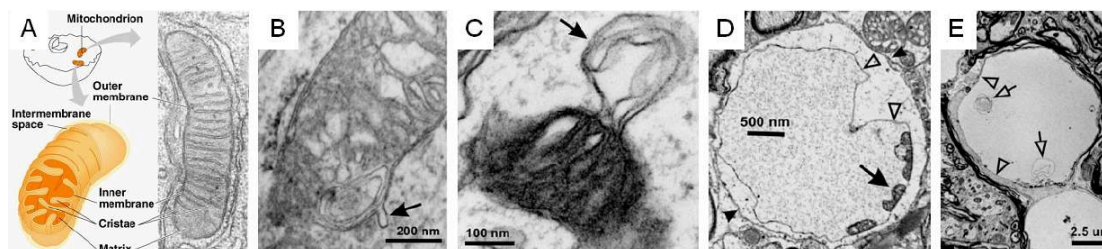


Abb. 1.1.3.: Verlauf der mitochondrialen Vakuolisierung. A: schematischer Aufbau eines Mitochondrions (links) und seine Darstellung in einer elektronenmikroskopischen Aufnahme (rechts), © Addison Wesley Longman, Inc. B-E: Bildung der Vakuolen (aus: Higgins et al., 2003). Genauere ultrastrukturelle Studien kamen schon früh zu der Annahme, dass die Vakuolisierung durch eine extreme Erweiterung des Intermembranraumes zustande kommt (Bendotti et al., 2001, Jaarsma et al., 2001), die aus der fortschreitenden Trennung und Entfernung von äußerer und innerer Membran resultiert. Dabei beginnt die initiale Trennung der beiden Membranen in kleinen Bläschen (B), die sich ausweiten (C) und abschließend ausgereifte Vakuolen von mehreren µm Durchmesser bilden (D,E). Dabei bildet die äußere mitochondriale Membran (OMM) den Außenrand der Vakuole (leere Pfeilköpfe in D und E), die u.U. direkt der dendritischen (gefüllter Pfeilkopf in D) oder axonalen Zellmembran anliegt, während die innere mitochondriale Membran (IMM) kollabiert und in kleinen vesikulären Elementen innerhalb der Vakuolen vorliegt (großer Pfeil in D, kleiner leerer Pfeil in E).

Mitochondrien erfüllen im Metabolismus der Zelle drei wichtige Funktionen: 1. die Veratmung von molekularem Sauerstoff zur ATP-Produktion durch die Atmungskette, 2. die Induktion des intrinsischen, apoptotischen Reaktionsweges durch die Ausschüttung von Cytochrom c und 3. die Aufnahme von Ca^{2+} -Ionen zur Konstanthaltung der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration. Hinweise auf Defekte in wichtigen Proteinkomplexen der Atmungskette als mögliche Ursache der ALS ergaben sich aus einigen genetischen Befunden von Patienten der SALS (Vielhaber et al., 2000), ebenso wie im $\text{SOD1}^{\text{G93A}}$ -Mausmodell (Jung et al., 2002). Außerdem findet sich in $\text{SOD1}^{\text{G93A}}$ -transgenen Mäusen die Freisetzung von Cytochrom c aus Mitochondrien und die daraus resultierende Aktivierung der Caspasen (Pasinelli et al., 2000, Guegan et al., 2001). Ein Verlust der Kapazität zur Ca^{2+} -Aufnahme in die Mitochondrien wird momentan im Zusammenhang mit der glutamatergen Erregungstoxizität diskutiert (Kawamata and Manfredi, 2010), die im Folgenden genauer erläutert wird.

1.1.3.3 Erregungstoxizität

Hinweise auf eine Beteiligung der Erregungstoxizität an der Degeneration der Motoneurone ergaben sich bereits in mehreren Befunden sowohl in ALS-Patienten als auch verschiedenen Tiermodellen (siehe z.B. Van Damme et al., 2005). Eine Erregungstoxizität mit anschließender Degeneration von Neuronen resultiert aus einer Übererregung mit dem exzitatorischen Neurotransmitter Glutamat und wird bei unterschiedlichen pathologischen Befunden wie Infarkten, Epilepsien und neurodegenerativen Krankheiten beobachtet (Coyle and Puttfarcken, 1993). Ursache dafür ist ein dauerhafter und für die Zelle nicht mehr zu kontrollierender Kalziumeinstrom durch AMPA- (2-amino-3-(5-methyl-3-oxo-1,2-oxazol-4-yl)propanoic acid)

und NMDA- (*N-Methyl-D-aspartate*)-Rezeptoren, der entweder durch den Anstieg der extrazellulären Glutamatkonzentration oder durch eine Überempfindlichkeit des postsynaptischen Neurons auf physiologische Glutamatkonzentrationen entsteht und in einer Ca^{2+} -induzierten Überaktivierung verschiedener Enzyme wie Proteinkinasen, Proteinphosphatasen, Phospholipasen, Endonucleasen und Oxidasen resultiert. Daraus folgt außerdem eine Überladung der Mitochondrien mit Ca^{2+} und anschließender Dysfunktion des Organells. Dies resultiert in der Produktion sogenannter ROS (*reactive oxygen species*, siehe 1.1.3.4), die wiederum die zellulären Proteine angreifen und zerstören, was letztendlich zur Degeneration des Neurons führt. Neben einer vermehrten Ausschüttung von Glutamat aus der Präsynapse kommen Mutationen und damit Defekte des glialen Glutamat-Transporters EAAT2 (*excitatory amino acid transporter*) als Ursache der Erregungstoxizität in der ALS in Frage (Rothstein et al., 1995), bei dessen Ausfall die Glutamatkonzentration im synaptischen Spalt und damit die Erregungsdauer des postsynaptischen Neurons ansteigt. Entsprechend führen diverse beta-Lactam-Antibiotika, die die Expression des EAAT2 in Astrozyten erhöhen, in ALS-Mausmodellen zu einer Verzögerung des Krankheitsbeginns und einer verlängerten Überlebensdauer (Rothstein et al., 2005). Ein weiteres starkes Argument für eine Beteiligung der glutamatergen Erregungstoxizität an der ALS-Pathologie ist die Verzögerung des Krankheitsverlaufes durch die Gabe des Glutamat-Inhibitors Riluzol (Lacomblez et al., 1996), dem bisher einzigen Medikament im Kampf gegen die ALS.

Aus der Annahme, dass die Erregungstoxizität durch einen übermäßigen Ca^{2+} -Einstrom zustande kommt, ergibt sich außerdem eine mögliche Erklärung für die selektive Vulnerabilität der Motoneurone, da sie im Vergleich zu anderen Neuronen einen sehr hohen Anteil an Ca^{2+} -permeablen AMPA-Rezeptoren exprimieren (Carriedo et al., 1996). Außerdem weisen sie eine verringerte Kapazität auf, das einströmende Kalzium abzupuffern (Lips and Keller, 1998, Vanselow and Keller, 2000), was sich durch die fehlende Expression der kalziumbindenden Proteine Parvalbumin und Calbindin erklärt (Alexianu et al., 1994). Die Tatsache, dass die offensichtlich gegen die ALS-Pathologie resistenten Augenmuskelkerne im Hirnstamm (Ncl. oculomotorius, Ncl. trochlearis und Ncl. abducens) im Gegensatz zu z.B. dem Ncl. hypoglossus und den spinalen Motoneuronen eine Expression von Parvalbumin und Calbindin zeigen, ist ein weiterer starker Hinweis für eine Beteiligung der Erregungstoxizität an der selektiven Degeneration der Motoneurone.

1.1.3.4 Oxidativer Stress

Als oxidativen Stress bezeichnet man die Entstehung übermäßiger Mengen an freien Sauerstoffradikalen, sogenannten ROS (*reactive oxygen species*, z.B. Superoxid, Hydroxylradikale,

Wasserstoffperoxid, Peroxinitrit etc.) und die daraus resultierenden, oxidativen Schäden an zellulären Proteinen (siehe Halliwell and Gutteridge, 1984, oder Avery, 2011). Seit der Entdeckung der SOD1-Mutation als Ursache der FALS (Rosen, 1993) durch die Fehlfunktion des Enzyms mit vermindertem Abbau oder gar Produktion von ROS wird oxidativer Stress als mögliche Ursache oder krankheitsfördernder Effekt in der Pathologie der ALS diskutiert. Hinweise auf eine oxidative Schädigung von Proteinen, DNA und Lipiden der Motoneurone und Gliazellen finden sich sowohl in Patientengewebe (Abe et al., 1997), als auch im Tiermodell (Liu et al., 1999, Poon et al., 2005). Ebenso wie die SOD1-Mutation resultieren auch Dysfunktionen der Mitochondrien (siehe 1.1.3.2) und die Erregungstoxizität (siehe 1.1.3.3) in oxidativem Stress, der damit eine generelle Folge der initialen Ursachen der ALS darstellt.

1.1.4 Neuroinflammation als Motor der ALS-Progression

Neben der intrazellulären Komponente des oxidativen Stresses ist auch eine die Degeneration der Motoneurone begleitende Neuroinflammation ein unabhängig von der initialen Ursache generelles Phänomen in der Pathogenese der ALS, das in den letzten Jahren zunehmend Bedeutung in der Forschung gewinnt. Unter Neuroinflammation versteht man die „Aktivierung“ von Astrozyten und Mikroglia (siehe unten) als Reaktion auf Infektion, Infarkt, traumatische Schädigung des Gehirns oder neurodegenerativen Erkrankungen (Allan and Rothwell, 2003, Lee et al., 2009, Glass et al., 2010). Während eine akute Inflammation z.B. im Fall einer Infektion oder eines Infarktes eine neuroprotektive Wirkung auf das geschädigte Gewebe ausübt, selbstlimitierenden Kaskaden unterliegt und sich (eventuell unter Narbenbildung durch Astrozyten) zurückbildet (siehe z.B. Glass et al., 2010, Allaman et al., 2011), kommt es im Fall der Neurodegeneration zu einer chronischen Inflammation, deren Wirkung ins Neurotoxische umschlägt (Allan and Rothwell, 2003).

Eine solche neuronale Inflammation umgibt typischerweise die Gebiete degenerierender Motoneurone bei ALS-Patienten, sowohl im Kortex als auch im Rückenmark (Kushner et al., 1991, Nagy et al., 1994). Wie bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson, FTD und Chorea Huntington (Schipper, 1996) wurde dieses auch als Gliosis bekannte Phänomen lange als eine unspezifische Reaktion der Glia auf eine Schädigung des neuronalen Gewebes angesehen. Insbesondere bei der ALS wird seit einiger Zeit jedoch eine aktive Rolle aktivierter Astrozyten und Mikroglia an der Entstehung, vor allem aber der Ausbreitung der Degeneration von Motoneuronen diskutiert (Cleveland and Rothstein, 2001, McGeer and McGeer, 2002), die durch neue Erkenntnisse an den SOD1-basierten Mausmodellen der ALS massive Unterstützung erfährt. So zeigte sich, dass in chimären Mäusen (be-

sitzen sowohl nur Wildtyp- als auch nur mutierte SOD1-exprimierende Zellen) Motoneurone, die mutierte SOD1 exprimieren, überleben können, wenn sie von Wildtyp-SOD1-exprimierenden Gliazellen umgeben sind, während Wildtyp-SOD1-exprimierende Motoneurone in der Umgebung von Gliazellen, die mutierte SOD1 exprimieren, degenerieren (Clement et al., 2003). Weitere Untersuchungen mit Mausmodellen, die mutierte SOD1 nur unter einem zellspezifischen Promotor exprimieren, zeigten, dass die Expression mutierter SOD1 alleine in einem der beteiligten Zelltypen (Astrozyten, Mikroglia, Motoneurone bzw. Neurone allgemein) eine ALS-Pathologie induzieren kann (Boillee et al., 2006, Papadimitriou et al., 2010, Allaman et al., 2011).

Diesen Ergebnissen entsprechend handelt es sich bei der ALS also um eine so genannte nicht-zellautonome Erkrankung, bei der insbesondere die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren durch Astrozyten und Mikroglia (Details siehe unten) der entscheidende Mechanismus sein könnte, über den die Neurodegeneration i) in einzelnen geschädigten Motoneuronen induziert wird (Di Giorgio et al., 2007, Liang et al., 2008), ii) diese sich innerhalb des geschädigten Gewebes lokal ausbreitet (Boillee et al., 2006, Yamanaka et al., 2008) und iii) von den zuerst betroffenen sekundären Motoneuronen in Rückenmark und Hirnstamm auf die primären Motoneuronen im Kortex übertragen wird (Kiernan et al., 2011, Philips and Robberecht, 2011).

1.1.4.1 Ursachen und Folgen der Astroglia-Aktivierung in der ALS

Die aus neuronalen Vorläuferzellen entstehenden Astrozyten stellen den größten Anteil an Zellen im ZNS und erfüllen im physiologischen Zustand die wichtige Aufgabe der Ionen-, Wasser- und Kaliumhomöostase sowie die der Ausschüttung neurotropher Faktoren (Pehar et al., 2005, Perea et al., 2009, Santello and Volterra, 2009). Äußerst wichtig ist auch ihr enger Kontakt zu glutamatergen Synapsen (Rossi and Volterra, 2009), wo sie u.a. für die schnelle Wiederaufnahme des ausgeschütteten Glutamats durch den EAAT2 verantwortlich sind und damit eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Erregungstoxizität spielen (siehe 1.1.3.3). Nach einer Schädigung des ZNS durch Infarkt, Verletzung oder Erkrankung reagieren die Astrozyten in den betroffenen Regionen mit Proliferation und wechseln in einen reaktiven Phänotyp, der sich morphologisch durch einen vergrößerten Zellkern und -körper sowie die Ausbreitung von dicken Zellfortsätzen mit einem erhöhten Anteil *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) kennzeichnet (Sofroniew and Vinters, 2010). Phänotypisch äußert sich diese Aktivierung vor allem in der Produktion verschiedener Zytokine wie Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF α), Interleukin 1 beta (IL-1 β) und IL-6, deren Level auch in der ALS erhöht sind (Boillee et al., 2006, Marchetto et al., 2008) und die – insbesondere Prostaglandin E₂ (PGE₂), Fas-Ligand

(FasL) und NO (Raoul et al., 2002, Raoul et al., 2006, Liang et al., 2008) – apoptotische Signalwege in den Motoneuronen anstoßen können. Tatsächlich löst der Medienüberstand aktivierter, SOD1-transgener Astrozyten in gesunden Motoneuronen Apoptose aus (Di Giorgio et al., 2007, Nagai et al., 2007), während konditioniertes Medium von Wildtyp-Astrozyten keinen Effekt erzeugt. Dabei ist jedoch weder die Rolle der SOD1 noch der induzierende Faktor bekannt; Glutamat sowie die meisten Zytokine wurden aufgrund ihrer geringen Level im Überstand allerdings ausgeschlossen (Nagai et al., 2007, Papadimitriou et al., 2010). Wie schon aus der Chimären-Studie (Clement et al., 2003) *in vivo* bekannt, implizieren auch diese *in vitro*-Ergebnisse eine entscheidende Rolle SOD1-positiver Astrozyten bei der Entstehung der Motoneuronendegeneration.

1.1.4.2 Ursachen und Folgen der Mikroglia-Aktivierung in der ALS

Mikroglia sind die residenten Makrophagen des Zentralnervensystems, im Gegensatz zu den Astrozyten also nicht neuronalen, sondern mesodermal/hämatopoetischen Ursprungs (Streit, 2002b, Ransohoff and Perry, 2009). Wie andere Zelltypen des angeborenen Immunsystems patrouillieren sie im ramifizierten, ruhenden Zustand, der morphologisch durch einen kleinen Zellkörper mit zahlreichen, stark verzweigten Fortsätzen gekennzeichnet ist, durch das Gewebe. Ebenso wie Astrozyten reagieren auch die Mikroglia auf Infektion, Schaden oder Erkrankung des Nervengewebes mit einer „Aktivierung“ (Moisse and Strong, 2006), die sowohl in Patienten der ALS (Turner et al., 2004) als auch verschiedenen Mausmodellen (Henkel et al., 2004, Kassa et al., 2009) beobachtet wird. Dabei wechseln die Mikroglia i) in eine amöboide Zellform mit vergrößertem Zellkörper und nur wenigen Zellfortsätzen (Streit, 2002a) ii) von der Ausschüttung anti-inflammatorischer Zytokine zu pro-inflammatorischen Substanzen und ROS-Produktion (Beers et al., 2008, Henkel et al., 2009) sowie iii) zu Phagozytose und Antigen-Präsentation (Kreutzberg, 1996). Anders als bei Astrozyten lassen sich bei der Mikroglia zwei unterschiedliche Aktivitätsmodalitäten voneinander unterscheiden (Ebert et al., 2008, Henkel et al., 2009): Während durch Stimulation mit Interferon gamma ($\text{IFN}\gamma$) oder dem bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS) der sogenannte M1-Phänotyp induziert wird, der sich durch Antigen-Präsentation und die Produktion von $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, ROS und NO äußert und ein generell neurotoxisches Milieu generiert, kommt es bei Stimulation mit IL-4 und IL-10 zur Ausbildung des M2-Phänotyps, der durch die Ausschüttung anti-inflammatorischer und neurotropher Faktoren eine neuroprotektive Wirkung hat (Beers et al., 2008, Henkel et al., 2009).

Im Allgemeinen wird angenommen, dass es im Verlauf der ALS über die Ausschüttung verschiedener Zytokine durch Astrozyten oder Motoneurone (z.B. CCL2, siehe Appel et al., 2010) zunächst zu einer M2-Aktivierung der Mikroglia kommt (Abb. 1.1.4), die durch ihre neuroprotektive Wirkung die Progression der Neurodegeneration verlangsamt (Moisse and Strong, 2006, Henkel et al., 2009, Philips and Robberecht, 2011). Detektiert die Mikroglia jedoch von geschädigten Motoneuronen freigesetzte mutierte SOD1 (Urushitani et al., 2006) oder ATP (Yiangou et al., 2006), wechselt sie in den M1-Phänotyp (Yiangou et al., 2006, Henkel et al., 2009), dessen pro-inflammatorische Wirkung die Progression der Motoneurodegeneration stark vorantreibt (Abb. 1.1.5).

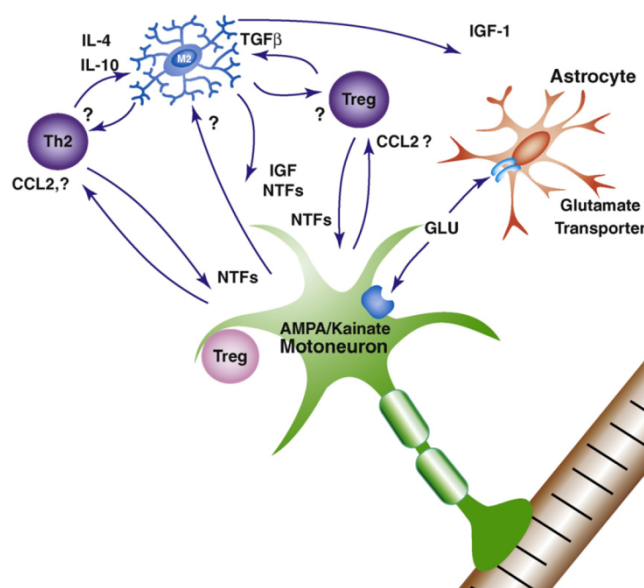


Abb. 1.1.4: Status der Neuroinflammation im frühen Krankheitsstadium. Durch die Ausschüttung bisher unbekannter Faktoren induzieren geschädigte Motoneurone M2-Mikroglia und rekrutieren Th2- und Treg-Lymphozyten über verschiedene Zytokine wie CCL2. Diese halten durch die Produktion von TGFβ bzw. IL-4 und IL-10 den neuroprotektiven M2-Phänotyp der Mikroglia aufrecht. Die von T-Zellen und M2-Mikroglia ausgeschütteten neurotrophen Faktoren (NTFs), z.B. *Insulin-like growth factor 1* (IGF-1), wirken sich positiv auf das Überleben der Motoneurone aus und verstärken die neuroprotektiven Eigenschaften der Astrozyten. Außerdem interagieren M2-Mikroglia durch verschiedene Faktoren mit den Th2- und Treg-Zellen, was außerdem zu einer Aufrechterhaltung des neuroprotektiven Milieus beiträgt. Dadurch wird die Degeneration der Motoneurone in dieser Phase aufgehalten und die Krankheitsprogression verlangsamt. Aus: Appel et al. (2010)

1.1.4.3 Infiltration von T-Lymphozyten

Lange Zeit galt das ZNS als von der adaptiven Immunantwort ausgeschlossen, doch ist inzwischen bekannt, dass im Fall diverser neurodegenerativer Erkrankungen und neuronaler Schädigung ein enger Austausch zwischen dem peripherem Immunsystem und dem Nervengewebe entsteht (für eine detaillierte Übersicht, siehe Kerschensteiner et al., 2009). Ein wesentlicher Bestandteil dieser Interaktion ist die Rekrutierung von Lymphozyten und deren Infiltration in das geschädigte Nervengewebe, ein Phänomen, das auch bei Patienten und Mausmodellen der ALS beobachtet wurde (Engelhardt et al., 1993, Alexianu et al., 2001, Beers et al., 2008). Während der präsymptomatischen Phase der ALS kommt es vor allem zu einer Rekrutierung von T-Helferzellen des Typs 2 (Th2) und regulatorischen T-Zellen (Treg). Diese se-

treten die Interleukine 4 und 10 (IL-4 und IL-10), die einen entscheidenden Beitrag zur Induktion und Aufrechterhaltung des M2-Phänotyps der Mikroglia beitragen (siehe Abb. 1.1.4). Wechselt die Mikroglia nach der Detektion von SOD1 jedoch in den M1-Phänotyp (siehe oben), kommt es in der späten Krankheitsphase zur Rekrutierung von Th1- und zytotoxischen T-Lymphozyten (siehe Abb. 1.1.5). Dabei unterstützen die Th1-Lymphozyten durch die Produktion von $\text{IFN}\gamma$ die Aufrechterhaltung des M1-Phänotyps, während die zytotoxischen T-Killerzellen, aktiviert durch die Antigen-Präsentation von SOD1 durch die M1-Mikroglia, die Motoneurone direkt in die Degeneration treiben, indem (z.B. über Fas-Ligand) apoptotische Signalwege induziert werden. Es ist also eine frühe, die Erkrankung verlangsamen Phase der M2/Th2/Treg-Interaktion zu unterscheiden von einer späteren Phase der M1/Th1-Interaktion mit Aktivierung von T-Killerzellen, die die Degeneration der Motoneurone drastisch verschärft (Beers et al., 2008, Appel et al., 2010).

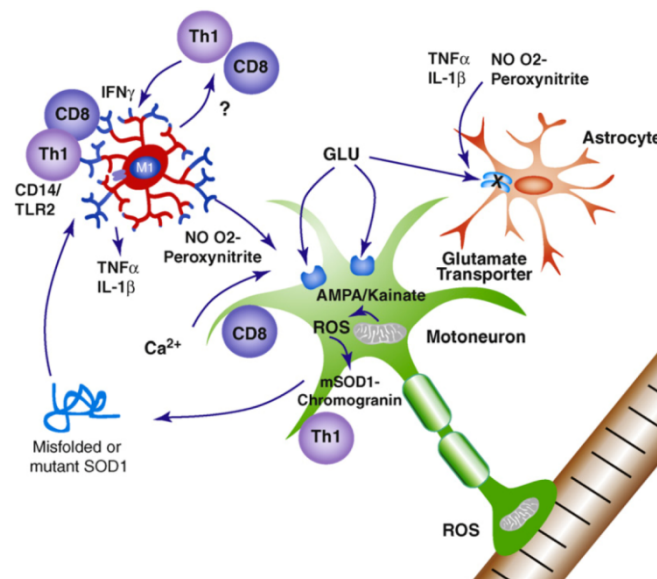


Abb. 1.1.5: Status der Neuroinflammation im späten Krankheitsstadium. Detektieren Mikroglia über den CD14/TLR2-Rezeptor extrazelluläres SOD1, das von geschädigten Motoneuronen exportiert oder durch Degeneration freigesetzt wurde, wechseln sie in einen neurotoxischen M1-Phänotyp mit Antigen-Präsentation. Durch die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO), freien Sauerstoffradikale (ROS , z.B. O_2^- und Peroxynitrit), Tumor Nekrosis Faktor alpha ($\text{TNF}\alpha$) und Interleukin 1β ($\text{IL-1}\beta$) kommt es zur Schädigung von Motoneuronen und Astrozyten. Durch noch unbekannte Faktoren und die Antigen-Präsentation der M1-Mikroglia werden Th1-Lymphozyten, die durch die Ausschüttung von Interferon gamma ($\text{IFN}\gamma$) den M1-Phänotyp aufrechterhalten, und T-Killerzellen (CD8^+) rekrutiert. Letztere können an den Motoneuronen direkt apoptotische Signalwege induzieren. Aus: Appel et al. (2010)

1.1.4.4 Zeitverlauf und Mechanismen der Neuroinflammation in der ALS

Bei der Neuroinflammation in der ALS kommt es also zunächst zu einer initialen neuroprotektiven Phase, die bereits vor Beginn der klinischen Symptomatik auftritt, vermutlich durch von Astrozyten und Motoneuronen ausgeschüttete Faktoren induziert wird und die Progression der Krankheit verlangsamt. Diese ist zu unterscheiden von einer späteren, neurotoxischen Phase, die durch den Umschlag der Mikroglia vom M2- auf den M1-Phänotyp und die Rekrutierung von Lymphozyten gekennzeichnet ist. Durch Produktion von ROS sowie die Ausschüttung von pro-inflammatorischen und pro-apoptischen Substanzen werden die Mo-

torneurone zusätzlich geschädigt, in die Degeneration getrieben und somit die Progression der Erkrankung forciert (Henkel et al., 2009, Appel et al., 2010, Papadimitriou et al., 2010, Philips and Robberecht, 2011). Die Interaktionen zwischen den beteiligten Zelltypen sind dabei vielfältig, so können z.B. von Motoneuronen ausgeschüttete Substanzen sowohl Astrozyten also auch Mikroglia aktivieren (Kang and Rivest, 2007), Astrozyten über verschiedene Zyto- und Chemokine die Aktivität der Mikroglia beeinflussen (Moisse and Strong, 2006) und diese *vice versa* über Zytokine und NO die Astrozytenaktivität modulieren sowie über Chemokine Lymphozyten rekrutieren, deren Faktoren wiederum auf Mikroglia, Astrozyten und Motorneurone wirken. Im Zentrum steht dabei die Induktion der NO und ROS produzierenden Enzyme NO-Synthase (NOS), NADPH-Oxidase (NOX) und Cyclooxygenase (COX) sowie die pro-inflammatorischen Zytokine TNF α , IL-1 β und IL-6. Eine singuläre Deletion von TNF α beziehungsweise IL-1 β (Nguyen et al., 2001, Gowing et al., 2006) hatte jedoch ebenso wenig einen Einfluss auf Krankheitsbeginn oder -progression wie eine Unterbindung der gesamten Astroglia- beziehungsweise Mikroglia-Aktivierung (Gowing et al., 2008). Während das Fehlen einzelner Faktoren in der Vielzahl an freigesetzten Zytokinen vermutlich untergeht, erklärt sich das Ausbleiben von Effekten bei einer Unterdrückung der gesamten Inflammation wahrscheinlich durch die fehlenden neuroprotektiven Einflüsse der Gliareaktion in der initialen Krankheitsphase (Philips and Robberecht, 2011). Vielversprechender war hingegen eine Deletion der NOX (Wu et al., 2006, Marden et al., 2007, Harraz et al., 2008) sowie der Einsatz des generell anti-inflammatorisch wirkenden Lenalidomids, wodurch sich die Krankheitsprogression im SOD1-Mausmodell deutlich verlangsamte (Neymotin et al., 2009).

1.1.5 Die ALS als multifaktorielle Erkrankung

Nach dem heutigen Stand der Forschung ist entsprechend der oben beschriebenen Erkenntnisse zur Pathologie der ALS davon auszugehen, dass das Krankheitsbild zwar in den selben finalen Effekten wie Proteinaggregationen, oxidativem Stress und neuronaler Inflammation endet, diese Mechanismen aber durch ein Zusammenspiel vieler Ursachen, von Genmutationen diverser Proteine bis hin zu verschiedensten Umwelteinflüssen und Risikofaktoren, ausgelöst werden können. Zudem erfolgt die Diagnose beim Menschen frühestens mit dem Auftreten der ersten Symptome, durch die schwierige Unterscheidung zu anderen Erkrankungen in der Regel jedoch erst weit danach, so dass Therapieansätze zur Ursachenbekämpfung schwierig erscheinen.

Die Ziele einer therapieorientierten Forschung sind dementsprechend: i) die Entdeckung bzw. Entwicklung eines Biomarkers, mit dem die ALS schnell und eindeutig diagnostiziert

werden kann, um einen frühestmöglichen Beginn der Therapie zu ermöglichen; ii) die molekularen Ursachen der Resistenz bestimmter Subpopulationen an Motoneuronen aufzuklären, um diese Erkenntnisse auf therapeutische Maßnahmen zum Schutz der vulnerablen Neurone zu übertragen, und iii) Möglichkeiten zu entwickeln, mit denen sich die durch die Gliazellen produzierte Inflammation von einem neurotoxischen Niveau in ein neuroprotektives Niveau zurückführen beziehungsweise dort erhalten lässt, so dass die Krankheitsprogression gestoppt und geschädigte Motoneurone vor der Degeneration geschützt werden können. (Papadimitriou et al., 2010, Philips and Robberecht, 2011)

1.2 Calcitonin gene-related peptide (CGRP)

Das 1983 entdeckte *Calcitonin gene-related peptide* (Rosenfeld et al., 1983) ist ein im peripheren und zentralen Nervensystem (PNS und ZNS) weit verbreitetes Neuropeptid, das zusammen mit Calcitonin (CT, 25% Homologie) die CGRP/CT-Peptid-Familie bildet. Zu dieser Familie gehören auch Amylin (AM, 50% Homologie) und Adrenomedullin (ADM, 25% Homologie, Wimalawansa, 1996, van Rossum et al., 1997, siehe Abb. 1.2.1), sowie die erst wesentlich später entdeckten *Calcitonin receptor stimulating peptides* (CRSPs, Katafuchi and Minamino, 2004). Letztere sind zwar in Schweinen und Hunden, nicht aber in Mäusen, Ratten oder dem Menschen exprimiert und bezüglich ihrer physiologischen Funktion noch wenig untersucht (Katafuchi et al., 2009).

Bisher sind zwei Isoformen des CGRP bekannt: α CGRP (CGRP-I) und β CGRP (CGRP-II), wobei diese sich bei Ratte und Maus lediglich in einer, beim Menschen in vier Aminosäuren unterscheiden (Amara et al., 1985) siehe Abb. 1.2.1). Alle Mitglieder dieser Peptidfamilie besitzen eine ähnliche Sekundärstruktur und wirken an G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (siehe 1.2.2).

Calcitonin	CGNLSTCMLGTYTQDLNKFHTFPQTSIGVGAP-NH ₂
alpha-CGRP	ACDTATCVTHRLAGLLSRSGGVVKNFVPTNVGSKAF-NH ₂
beta-CGRP	SCNTATCVTHRLAGLLSRSGGVVKDNFVPTNVGSEAF-NH ₂
Amylin	KCNTATCATQRLANFLVRSNNLGPVLPPTNVGSNTY-NH ₂
ADM (12-50)	GCRFGTCTMQKLAHQIYQFTDKDKDGMAPRNKISPPQGY-NH ₂

Abb. 1.2.1. Peptidsequenzen der humanen CGRP-Familie. Beim Menschen unterscheiden sich α CGRP und β CGRP in vier Aminosäuren; Amylin zeigt 50% Homologie, Adrenomedullin (ADM) 25%. Hoch konserviert sind u.a. die Cysteine an Position 2 und 7 bei CGRP und Amylin bzw. 16 und 21 bei ADM, zwischen denen sich die für die Rezeptorbindung wichtige Disulfidbrücke ausbildet.

α CGRP entsteht durch gewebespezifisches, alternatives *Splicing* des auf Chromosom 11 lokalisierten Calcitonin-Gens (*CALCA*). Während in den parafollikulären Zellen der Schilddrüse hauptsächlich Calcitonin (>95%) aus den Exonen 1-4 entsteht (Sabate et al., 1985), exprimieren Neurone ausschließlich α CGRP unter Verwendung der Exone 1-3, 5 und 6. Es wird vermutet, dass das CGRP-spezifische *Splicing* den vorgegebenen Weg darstellt, während das Calcitonin-spezifische *Splicing* in den parafollikulären Zellen durch die Aktivierung des *exonicsplicing enhancers* SRp55 induziert wird (Tran et al., 2003, Tran and Roesser, 2003). β CGRP hingegen wird von einem eigenen, ebenfalls auf Chromosom 11 lokalisierten Gen (*CALCB*) kodiert, in dem im Gegensatz zu *CALCA* kein alternatives *Splicing* stattfindet.

Beide CGRP-Isoformen sind 37 Aminosäuren lang und bilden zwischen den Cysteinen der

Positionen 2 und 7 eine Disulfidbrücke, der C-Terminus ist amidiert. Die Sekundärstruktur aller Peptide der CGRP/CT-Familie ist charakterisiert durch einen durch die Disulfidbrücke entstehenden Ring am N-Terminus, eine amphipathische α -Helix zwischen den Aminosäureresten 8-18 und zwei β -Faltblättern, zwischen denen ein weniger strukturierter („*random coiled*“) Bereich zu finden ist (Saldanha and Mahadevan, 1991). Es wird angenommen, dass der weniger strukturierte C-Terminus und die α -Helix als Rezeptorbindedomäne fungieren, während die N-terminale Ringstruktur die Aktivierung des Rezeptors auslöst (Conner et al., 2002). Entsprechend üben N-terminal trunkierte Peptide wie CGRP₈₋₃₇ eine antagonistische Wirkung auf die CGRP-Rezeptoren aus (Dennis et al., 1989, Mimeault et al., 1992).

1.2.1 Expressionsprofil

CGRP ist in vielen Teilen des ZNS und PNS exprimiert, z.B. im Thalamus, Hypothalamus, den Motoneuronen der Hirnnervenkerne und im Rückenmark sowie den sensorischen Neuronen in den Hinterwurzelganglien (Wimalawansa, 1996). Mit Ausnahme des Kortex existieren zudem CGRP-haltige Projektionen in fast alle Bereiche des Gehirns und nahezu alle peripheren Organe (für eine detaillierte Übersicht siehe van Rossum et al., 1997). Außerdem wird CGRP in geringen Mengen auch in peripheren Organen wie der Thyroidea, dem Pankreas und dem Nebennierenmark gebildet (Sabate et al., 1985, Pettersson et al., 1986, Kuramoto et al., 1987). In all diesen Zellen wird CGRP, meist zusammen mit anderen Neuropeptiden wie Substanz P, in sekretorischen LDC (*large dense core*)-Vesikeln gespeichert, die zusammen mit den jeweiligen klassischen Neurotransmitter enthaltenden, kleineren SCC (*small clear core*)-Vesikeln in der Synapse akkumulieren (Weihe et al., 1991, Weihe, 1992). In den meisten Zellen sind α - und β CGRP kolokalisiert (Amara et al., 1985), jedoch gibt es einige wenige Gewebe, in denen es zu einer unterschiedlichen Verteilung der beiden Isoformen kommt. So besitzen die primären sensorischen Neurone der Hinterwurzelganglien einen 3-5fach höheren Anteil an α CGRP, während Neurone des intrinsischen, enterischen Nervensystems ausschließlich β CGRP exprimieren (Mulderry et al., 1988). Es ist daher anzunehmen, dass α - und β CGRP zumindest teilweise unterschiedliche Funktionen besitzen, wobei diese noch aufzuklären sind. Aufgrund des Fehlens isoformspezifischer Antikörper für α - bzw. β CGRP, die sich mit der hohen Homologie der Peptide begründet, konnte bisher nur die Expression von spezifischer mRNA ermittelt werden. Derartige Untersuchungen auf Proteinebene waren bisher unmöglich. Eine Lösung dafür brachte die Entwicklung von α CGRP-Knockout-Mäusen (Lu et al., 1999, Salmon et al., 1999), die sowohl eine genaue Analyse der Verteilung von β CGRP (Schutz et al., 2004), durch den resultierenden Phänotyp der α CGRP-Knockout-Tiere aber auch einen Rückschluss auf die Funktion von α CGRP zuließ (1.2.3).

1.2.2 Rezeptoren und intrazelluläre Signalwege

Die Existenz von hochaffinen Bindungsstellen für CGRP wurde durch ^{125}I -Markierung in diversen Spezies im Gehirn sowie vielen peripheren Organen wie Herz, Leber, Milz und quergestreifter Muskulatur festgestellt (Nakamuta et al., 1986). Dabei führte die Tatsache, dass in einigen Organen unterschiedliche Reaktionen auf CGRP-Antagonisten (CGRP8-37, siehe 1.2.1) beobachtet wurden, zu der Annahme, dass es verschiedene CGRP-Rezeptortypen mit unterschiedlicher Wirkung auf das sie exprimierende Organ gibt (Dennis et al., 1989). Entsprechend ihrer pharmakologischen Eigenschaften wurden die Rezeptoren unterteilt in die Antagonist-empfindlichen CGRP-Typ1-Rezeptoren und die Antagonist-resistenten CGRP-Typ2-Rezeptoren (Sexton et al., 1988). Bis heute ist nur das Gen und die Struktur des hochaffinen CGRP-Typ1-Rezeptors aufgeklärt (Kapas and Clark, 1995). Entsprechend der hohen Homologie zum Calcitonin-Rezeptor (CR) wird er als CRLR (*Calcitonin receptor like receptor*) bezeichnet. Wie viele Neuropeptid-Rezeptoren gehören die Rezeptoren der CT/CGRP-Familie den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren des Typs II an (Pondel et al., 2002), stellen unter diesen jedoch eine Besonderheit dar, weil sie (mit Ausnahme des CR) nur durch Heterodimerisierung mit einem von drei so genannten RAMPs (*receptor-activity-modifying proteins*, (McLatchie et al., 1998) und dem RCP (*receptor component protein*, Evans et al., 2000)) funktionstüchtig sind. Während das intrazelluläre RCP die Kopplung an ein G-Protein vermittelt, sorgen die kleinen, über eine Transmembrandomäne in die Zellmembran inserierten RAMPs dafür, dass CR bzw. CRLR i) an der Zelloberfläche exprimiert werden (Qi and Hay, 2010), ii) einen Liganden binden können (McLatchie et al., 1998) und iii) unterschiedliche Affinitäten für die Mitglieder der CT/CGRP-Familie ausbilden (Morfis et al., 2003, Hay et al., 2006, Sexton et al., 2006, Walker et al., 2010). Allein CR ist auch als Monomer und in dieser Form als Calcitonin-spezifischer Rezeptor funktionsfähig, die Rezeptoren für die restlichen Mitglieder der CT/CGRP-Familie ergeben sich durch Heterodimerisierung wie folgt: CR + RAMP2 oder 3 = Amylin-Rezeptor 1 beziehungsweise 2, CRLR + RAMP1 = CGRP-Rezeptor, CRLR + RAMP2 oder 3 = Adrenomedullin-Rezeptor 1 beziehungsweise 2. Zu bemerken ist allerdings, dass alle Heterodimere neben ihrer hochaffinen Spezifität zu einem der Peptide auch geringere Affinitäten zu den anderen Peptiden der CT/CGRP-Familie aufweisen. Der vollständige, Antagonist-sensitive CGRP-Typ1-Rezeptor besteht also aus CRLR, RAMP1 und RCP (siehe Abb. 1.2.2.), weist allerdings keinerlei Unterschiede in der Affinität für αCGRP und βCGRP auf. Ein molekulares Äquivalent für die in pharmakologischen Experimenten beobachteten, Antagonist-resistenten CGRP-Typ2-Bindestellen konnte bis heute nicht gefunden werden, doch nährt sich die Vermutung, dass es sich dabei um die durch die anderen Rezeptordimere (insbesondere CR/RAMP2 und CRLR/RAMP3) vermittelten Effekte handelt (Hay, 2007).

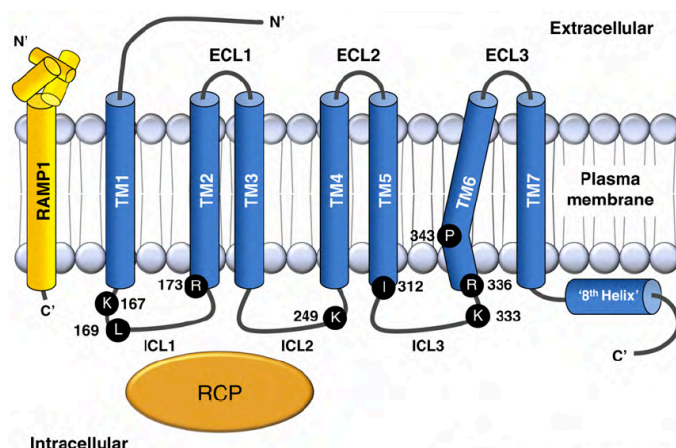


Abb. 1.2.2: Schematische Darstellung der CGRP-Rezeptorkomponenten. Der CGRP-Rezeptor ist ein Heterotrimer bestehend aus CRLR (blau) mit sieben Transmembrandomänen (TM), RAMP1 (gelb) mit nur einer TM und dem intrazellulär lokalisiertem RCP (orange). Angegeben sind außerdem die Positionen der für die Signaltransduktion und/oder die Rezeptorinternalisierung des CRLR funktionell wichtigen Aminosäuren. Zu bemerken sind dabei insbesondere der „Knick“ in TM6 und die achte, intrazelluläre Helix am C-Terminus. N' = N-Terminus, C' = C-Terminus, ECL = extracellular loop (extrazelluläre Schleife) ICL = intracellular loop (intrazelluläre Schleife). aus Walker et al. (2010)

Wie bei allen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren erfolgt die Signalweiterleitung durch die Dissoziation der G-Protein-Untereinheiten vom Rezeptor und darauffolgende Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden. Im Fall von CRLR/RAMP1 (im Folgenden CGRP-Rezeptor genannt) handelt es sich vorwiegend um die durch $G\alpha_s$ -Protein induzierte Aktivierung der Adenylatzyklase (AC) mit der daraus resultierenden Erhöhung von cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) und anschließender Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) (Drissi et al., 1998, Hay et al., 2005, Takhshid et al., 2006, siehe Abb. 1.2.3. A). Diese wiederum kann über Induktion von CREB (*cAMP responding element binding protein*) die Transkription beeinflussen, sowie weitere Proteinkinasen (z.B. ERK) oder die NO-Synthase aktivieren. Letzteres ist vor allem für den durch NO vermittelten, vasodilatorischen Effekt von CGRP verantwortlich.

Da die meisten Zellen mehrere RAMPs exprimieren und die bekannten Antagonisten ebenso wie die Ursprungspeptide der CT/CGRP-Familie schwache Affinitäten auf alle Rezeptoren ausüben, war eine genauere Differenzierung der intrazellulären Signalkaskaden und entsprechender physiologischer Effekte eines bestimmten Peptids bzw. dessen Rezeptors schwierig. Inzwischen gibt es jedoch auch nicht-peptiderge Antagonisten, die eine hohe Spezifität für einen bestimmten Rezeptor besitzen und in Zukunft näheren Aufschluss über Funktionen einzelner Peptide bzw. Rezeptoren geben und zudem gezielt zur Behandlung verschiedener Erkrankungen eingesetzt werden können. Spezifische CGRP-Antagonisten sind BIBN0496 und MK0974, die sich unter dem Namen *olcegepant* bzw. *telcagepant* in klinischen Studien der Phase III zur Behandlung von Migräne befinden (Doods et al., 2007, Ho et al., 2008, Williams et al., 2009).

1.2.3 Physiologische Funktionen

Entsprechend seiner weiten Verbreitung im ZNS mit Projektionen in fast alle peripheren Organe ist CGRP in diverse Funktionssysteme, z.B. die Regulation autonomer Funktionen, sensorische Integrationsprozesse und inflammatorische Reaktionen involviert (Wimalawansa, 1996, van Rossum et al., 1997), wobei die Effektorkaskaden in vielen Fällen nur unvollständig aufgeklärt sind. Meist entfaltet CGRP seine physiologische Wirkung als starker Vasodilatator (für eine Übersicht siehe Brain and Grant, 2004) und/oder Modulator neuroaktiver Transmitter und anderer Peptide, insbesondere im Bereich der Schmerzverarbeitung (Trang et al., 2005), der Motorik und der peripheren wie zentralen Inflammation (siehe unten). Besondere Beachtung erfährt CGRP aktuell durch eine tragende Rolle bei der Entstehung der Migräne, zu der sowohl die vasodilatatorischen, als auch die die Nozizeption und Inflammation verstärkenden Effekte beitragen (siehe Benemei et al., 2009). Die zugrundeliegenden Mechanismen, z.B. die Ausschüttung von CGRP durch Neurone des Ganglion trigeminale, sind aufgrund der starken klinischen Relevanz gut untersucht, der Einsatz von CGRP-Antagonisten als mögliche Therapie befindet sich bereits in klinischen Studien (siehe Edvinsson and Ho, 2010, Ho et al., 2010).

1.2.3.1 CGRP als Modulator von peripherer und zentraler Inflammation

Im Hinterwurzelganglion findet sich nicht in allen, sondern nur in einer Subpopulation von Neuronen und den von ihnen ausgehenden peripheren und zentralen Projektionen CGRP-Immunoreaktivität (Gibson et al., 1988a). Dabei handelt es sich um Neurone mit kleinen Zellkörpern und schwach bzw. unmyelinisierten, langsam leitenden Fasern vom Typ C oder A δ , die dem protopathischen Sensibilitätssystem angehören, das vor allem für die Wahrnehmung und Weiterleitung von Temperatur und (Inflammations-)Schmerz verantwortlich ist. In diesen Fasern wird CGRP in Kolokalisation mit anderen Neuropeptiden (v.a. Substanz P) in *Large-Dense-Core*-Vesikeln gespeichert (Gulbenkian et al., 1986, Nohr et al., 1995) und sowohl an peripheren als auch zentralen Nervenendigungen der sensorischen Neurone freigesetzt. CGRP übt eine verstärkende Wirkung auf die durch Substanz P (SP) vermittelten Effekte aus, indem es dessen Freisetzung erhöht und seinen Abbau verlangsamt (Oku et al., 1987, Le Greves et al., 1989). In der Folge kommt zu einer verstärkten Erregung der nozizeptiven Neurone durch SP, aber auch der inflammatorischen Reaktionen durch CGRP, das durch seine vasodilatierende Wirkung die Extravasation inflammatorischer Substanzen (z.B. Histamin, Bradykinin, Leukotriene, SP, etc.) induziert. Zudem konnte eine erhöhte CGRP-Expression während einer Inflammation beobachtet werden, und zwar sowohl in sensiblen Neuronen der

Hinterwurzelganglien bei peripherer Entzündung (Weihe et al., 1995, Nohr et al., 1999), als auch in kortikalen Neuronen bei zentralen Inflammationen (Rohrenbeck et al., 1999).

Sowohl Neurone als auch Mikroglia und Astrozyten exprimieren den CGRP-Rezeptor (Reddington et al., 1995, Moreno et al., 2002, D'Antoni et al., 2010), meist zusammen mit RAMP2 und/oder 3, Komponenten der anderen Rezeptoren für CT/CGRP-Peptide. In allen Fällen konnte die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels beobachtet werden, woraufhin es in Gliazellen vor allem zur Induktion von c-fos (Haas et al., 1991, Priller et al., 1995), NFkB und STAT1/2 und bei Neuronen von CREB (Wang et al., 2010) kommt. Diese Transkriptionsfaktoren können ihrerseits eine ganze Anzahl weiterer Gene induzieren. Bei Astrozyten konnte als Folge dessen seine deutliche morphologische Änderung von einer flachen, polygonalen Form hin zu einem stellaten Phenotyp mit zahlreichen Fortsätzen beobachtet werden, was auf eine Aktivierung der Astrozyten durch CGRP schließen lässt (Lazar et al., 1991, D'Antoni et al., 2010). Zusammen mit der Beobachtung, dass CGRP auch im Fall einer Axotomie in Motoneuronen hoch reguliert wird, besteht die Vermutung, dass CGRP generell als Signal geschädigter Neurone zur Aktivierung umgebender Gliazellen fungiert (Reddington et al., 1995).

1.2.3.2 CGRP als Modulator an der neuromuskulären Endplatte

In Motoneuronen wurde bei diversen Spezies sowohl im embryonalen als auch im adulten Stadium CGRP-Expression nachgewiesen (Gibson et al., 1984), wobei die Expression von CGRP in den Motoneuronen in etwa zeitgleich mit der Ausbildung der neuromuskulären Endplatten an der Muskulatur (New and Mudge, 1986) beginnt. Entsprechend wird eine Beteiligung von CGRP an dieser Entwicklung diskutiert, konnte bisher aber noch nicht eindeutig nachgewiesen werden. Da die α CGRP-Knockout-Tiere keine Veränderungen an der neuromuskulären Endplatte zeigen (Lu et al., 1999, Salmon et al., 1999), scheint diese Funktion von CGRP bei der Ausbildung neuromuskulärer Endplatten nicht essentiell zu sein oder kann allein durch β CGRP ausgeübt werden. In adulten Motoneuronen wird CGRP in Chromogranin-A-positiven Vesikeln zur neuromuskulären Endplatte transportiert, kolokalisiert dort mit Acetylcholin (ACh)-positiven Vesikeln und wird bei Erregung gleichzeitig mit ACh freigesetzt (Booj et al., 1989, Popper and Micevych, 1989). Im Muskel führt CGRP über $G\alpha_s$ zu einer Erhöhung der cAMP-Konzentration und der anschließenden Aktivierung der PKA (siehe 1.2.2.), zur Phosphorylierung und damit Desensibilisierung des ACh-Rezeptors. Ebenfalls konnte beobachtet werden, dass CGRP die Expression von ACh-Rezeptoren und der ACh-Esterase erhöht und damit auch längerfristig die Signalübertragung von Nerv zu Muskel moduliert (New and Mudge, 1986, Mülle et al., 1988, Choi et al., 1998). Erst vor kurzem wurde

gezeigt, dass der CGRP-Rezeptor-Komplex nicht von „langsamen“, sondern nur von „schnellen“ Muskelfasern exprimiert wird und via CREB die Expression des ACh-assoziierten Kollagenproteins CoQ-1a induziert (Choi et al., 2007). Zudem wurde beobachtet, dass die CGRP-Immunoreaktivität der innervierenden Motoneurone bei spinaler Muskelatrophie reduziert ist und die Muskeldegeneration einsetzt, bevor es zu einem Verlust an Motoneuronen kommt (Dachs et al., 2011).

1.2.4 CGRP in der Pathogenese der amyotrophen Lateralsklerose

Im gesunden thorako-lumbalen Rückenmark zeigt CGRP in diversen Spezies ein charakteristisches Immunreaktivitätsmuster aus sensiblen Fasern in der Lamina II des Hinterhorns (Substantia gelatinosa), den Somata der visceromotorischen, sympathischen Neurone im Seitenhorn und den Perikarya der somatischen Motoneurone im Vorderhorn (Wimalawansa, 1996, van Rossum et al., 1997). In den Fasersträngen der weißen Substanz findet sich normalerweise keine Immunreaktivität von CGRP, jedoch können die an den Wurzeln ein- bzw. austretenden Fasern eine leichte Immunreaktivität zeigen (Booj et al., 1989). In einer Studie in SOD1^{G93A}-transgenen Mäusen traten zusätzliche CGRP-Immunreaktivitäten im Neuropil des Vorderhorns ALS-kranker Tiere auf (Schutz et al., 2005, siehe Abb. 1.2.4), die auf eine Beteiligung von CGRP an der Pathogenese der ALS schließen lassen.

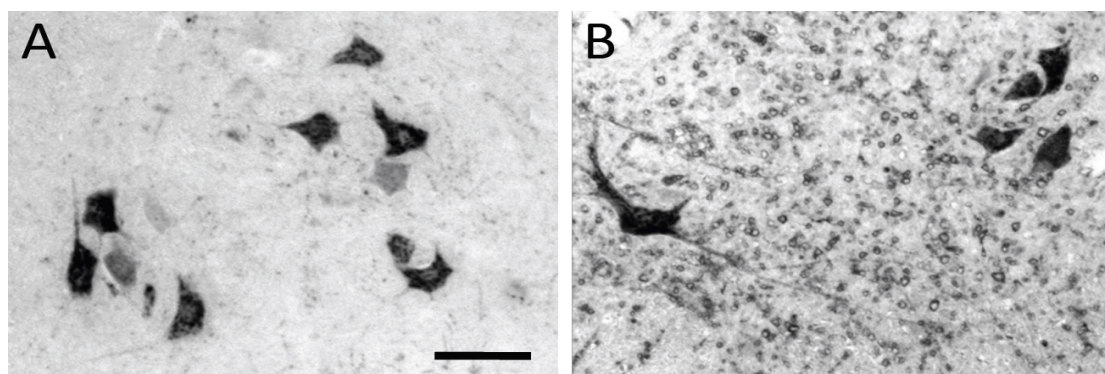


Abb. 1.2.4: CGRP-Immunreaktivität im Vorderhorn des lumbalen Rückenmarks (A) Wildtyp: Nur die Perikarya der Motoneuronen zeigen CGRP-Immunreaktivität. (B) ALS-Mausmodell (SOD1-G93A): Im Neuropil des Vorderhorns findet sich neben den Motoneuronen CGRP-Immunreaktivität in zahlreichen, runden Strukturen. Balken in (A) entspricht 50µm und gilt auch für (B). Verändert aus Schütz et al., 2005).

In einer anschließenden Studie zur genauen Charakterisierung (Ringer et al., 2009) konnte festgestellt werden, dass die CGRP-Immunreaktivität i) mit den SOD1-positiven Vakuolen (vermutlich degenerierende Mitochondrien, siehe 1.1.3.2) in den Dendriten, Axonen und Somata der Motoneurone kolokalisiert, ii) bereits ab dem postnatalen Tag (P) 40 und damit weit

vor Beginn der klinischen Symptomatik auftritt und iii) der Aktivierung von Astrozyten vorausgeht. Außerdem wurde gezeigt, dass die Immunoreaktivität von β CGRP ausgeht, während vornehmlich α CGRP-exprimierende Motoneurone auch in späten Krankheitsphasen noch eine gesunde Morphologie zeigen. Aus diesen Beobachtungen wurde geschlossen, dass von den Motoneuronen exozytiertes β CGRP die Astrozyten aktiviert und damit die Neuroinflammation induziert, während α CGRP in den Motoneuronen protektive Effekte ausüben könnte.

1.3 Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide

Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) ist ein pleiotrophisches und weit verbreitetes Neuropeptid mit unterschiedlichsten Funktionen im zentralen und peripheren Nervensystem, Gastrointestinal- und Reproduktionssystem sowie im Immunsystem (für detaillierte Übersichten siehe Vaudry et al., 2000, Vaudry et al., 2009). Bei seiner Entdeckung vor über 20 Jahren wurde das aus 38 Aminosäuren bestehende Polypeptid aus dem Hypothalamus isoliert und nach seiner Eigenschaft benannt, in Zellen der Epiphyse (*Glandula pinealis*) die Produktion von cAMP zu induzieren (Miyata et al., 1989). Ein Jahr später erfolgte die Entdeckung von PACAP27, der zweiten biologisch aktiven Variante des Polypeptids mit trunziertem C-Terminus (Miyata et al., 1990), das jedoch nur ca. 10% der gesamten PACAP-Expression im Gehirn und der Peripherie ausmacht (Arimura et al., 1991). Da sich die beiden Peptide zwar geringfügig in ihrer Rezeptoraffinität, nicht aber in ihrer Funktion unterscheiden (Dickson and Finlayson, 2009), wird im Einklang mit der Fachliteratur im Folgenden nicht mehr zwischen PACAP38 und PACAP27 differenziert.

Das PACAP kodierende Gen findet sich beim Menschen auf Chromosom 18 und bei der Maus auf Chromosom 17 (Hosoya et al., 1992, Yamamoto et al., 1998, Miyata et al., 2000), wobei das daraus translatierte Prepro-PACAP in beiden Fällen neben beiden PACAP Varianten noch ein zusätzliches Polypeptid, das sogenannte PRP (*PACAP-related peptide*) enthält (Vaudry et al., 2000) (siehe Abb. 1.2.1).

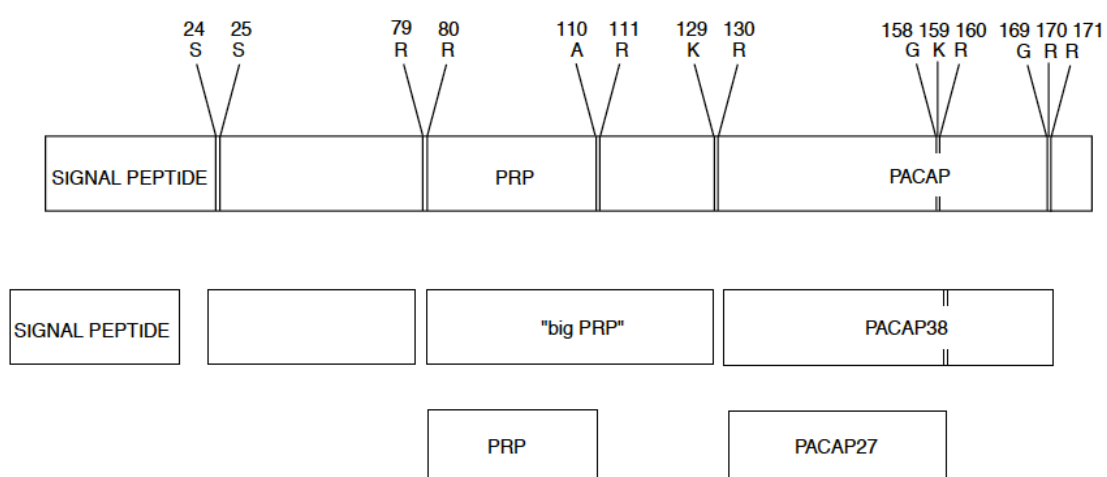


Abb. 1.3.1: Schematische Darstellung von Prepro-PACAP und der posttranslationalen Prozessierung. Gezeigt sind die Positionen der die Intron/Exon-Übergänge flankierenden Aminosäurereste (A: Alanin, G: Glycine, K: Lysine, Q: Glutamine, R: Arginine, S: Serine). PACAP: *pituitary adenylate cyclase activating polypeptide*, PRP: *PACAP related peptide*. Aus: Vaudry et al. 2009)

Basierend auf der Sequenzhomologie wird PACAP der Glucagon/Sekretin-Familie zugeordnet, wobei es die größte Übereinstimmung (68%) mit dem vasoaktiven intestinalen Peptid (VIP) aufweist (Miyata et al., 1990, siehe Abb 1.3.2). Obwohl als bisher letztes Mitglied dieser Peptidfamilie entdeckt, handelt es sich vermutlich um den phylogenetisch ältesten Vertreter, aus dem die anderen verwandten Peptide wahrscheinlich durch Genverdopplungen hervorgegangen sind (Sherwood, 2000). Bereits in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* findet sich ein PACAP-Homolog mit nachgewiesener Funktion bei Lernen und Gedächtnis sowie der Schlafregulation (Feany and Quinn, 1995, DeZazzo et al., 1999, Hashimoto et al., 2002).

	1	5				10				15				20				25				30				35				40																
GHRF	Y	A	D	A	I	F	T	N	S	Y	R	K	V	L	G	Q	L	S	A	R	K	L	L	Q	D	I	M	A	S	R	Q	Q	K	G	E	S	N	Q	E	R	G	A	R	A	R	I
GIP	Y	A	E	G	T	F	I	S	D	Y	S	I	A	M	D	K	I	H	Q	Q	D	F	V	N	W	L	L	A	G	F	I	A	W	L	V	K	K	N	D	W	K	H	N	I	T	Q
GLP-1	H	D	E	F	E	R	H	A	E	G	T	F	T	S	D	V	S	S	Y	L	E	G	Q	A	A	Q	L	G	F	I	A	W	L	V	K	G	R	G								
Glucagon	H	S	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	R	R	A	Q	D	F	V	Q	W	L	M	N	T																	
PACAP-27	H	S	D	G	I	F	T	D	S	Y	S	R	Y	R	K	Q	M	A	V	K	K	Y	L	A	A	V	L																			
PACAP-38	H	S	D	G	I	F	T	D	S	Y	S	R	Y	R	K	Q	M	A	V	K	K	Y	L	A	A	V	L	G	K	R	Y	K	Q	R	V	K	N	K								
PHM	H	A	D	G	V	F	T	S	D	F	S	K	L	L	G	Q	L	S	A	K	K	Y	L	E	S	L	M																			
PyP	D	V	A	H	G	I	L	N	E	A	Y	R	K	V	L	G	Q	L	S	A	G	K	H	L	Q	S	L	V	A																	
Sekretin	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V																			
VIP	H	S	D	A	V	F	T	D	N	Y	T	R	L	R	K	Q	M	A	V	K	K	Y	L	N	S	I	L	N																		

Abb. 1.3.2. Verwandtschaftsbeziehungen der PACAP/VIP-Familie. A: Der Vergleich der Proteinsequenzen zeigt vor allem im N-terminalen Bereich der Peptide eine hohe Konservierung. Aus Dickson and Finlayson, 2009).

1.3.1 Expressionsprofil

PACAP ist ein im ZNS sowie der Peripherie weit verbreitetes Peptid (detaillierte Übersicht siehe Fahrenkrug and Hannibal, 2004, Vaudry et al., 2009). Die höchste Konzentration findet sich im Hypothalamus (Arimura et al., 1991, Ghatei et al., 1993), doch kommen PACAP-exprimierende Neurone auch in vielen anderen Teilen des ZNS vor (Skoglosa et al., 1999, Hannibal, 2002), u.a. im limbischen System, dem Hippocampus, verschiedenen thalamischen Kernen, dem Kleinhirn und vielen Kernkomplexen des Hirnstammes, unter ihnen auch die somatomotorischen Neurone des Ncl. ambiguus, Ncl. dorsalis nervi vagii, Ncl. spinalis nucleii trigemini und Ncl. hypoglossus sowie die Motoneurone im Rückenmark (Legradi et al., 1994, Hannibal, 2002, Pettersson et al., 2004b).

In der Peripherie ist PACAP in den meisten sympathischen, parasympathischen, sensorischen und visceralen Ganglien, fast allen endokrinen Drüsen (z.B. Epiphyse, Nebenniere, Pankreas) sowie den Gonaden exprimiert (Vaudry et al., 2009). Von großer funktioneller Bedeutung ist außerdem die PACAP-Expression in vielen Organen und Zelltypen des Immunsystems und Tumorzellen (Gaytan et al., 1994, Reubi et al., 2000, Abad et al., 2002).

1.3.2 Rezeptoren und intrazelluläre Signalwege

Bisher sind drei Rezeptoren für PACAP bekannt, die alle der Familie G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (GPCR) des Typs II angehören. Zwei dieser Rezeptoren weisen eine ähnlich hohe Affinität für PACAP und VIP auf und werden entsprechend VPAC1 und VPAC2 benannt, während der dritte Rezeptor PAC1-R eine deutlich höhere Affinität für PACAP aufweist und entsprechend als PACAP-spezifischer Rezeptor gilt (Laburthe and Couvineau, 2002, Dickson, 2006, Laburthe et al., 2007). Alle Rezeptoren wurden bereits kurz nach der Entdeckung von PACAP kloniert und charakterisiert (VPAC1 Ratte: Ishihara et al., 1991, Human: Sreedharan et al., 1993, Maus: Johnson et al., 1996; VPAC2 Ratte: Morrow et al., 1993, Human: Svoboda et al., 1994; Maus: Inagaki et al., 1994; PAC1-R Ratte: Hashimoto et al., 1999, Human: Ogi et al., 1993, Maus: Hashimoto et al., 1996) und sind phylogenetisch ähnlich hoch konserviert wie ihre Liganden (Cardoso et al., 2007).

Als eine Besonderheit unter den Mitgliedern der GPCR Typ II Familie weisen die PACAP-Rezeptoren *Introns* und daraus resultierende *Splicing*-Varianten auf. Davon besonders betroffen ist der PAC1-Rezeptor, der durch Insertion verschiedener Kassetten (hip/hop) in die dritte intrazelluläre Schleife und verschiedener Modifikationen am N-Terminus acht verschiedene Varianten aufweist, die sich in ihrem Expressionsprofil, der Ligandenbindung sowie den intrazellulären Signalkaskaden unterscheiden (Spengler et al., 1993, Pantaloni et al., 1996, Dickson and Finlayson, 2009).

Wie alle Vertreter dieser Rezeptor-Familie besitzen VPAC1, VPAC2 und PAC1-R sieben Transmembrandomänen, wobei der extrazelluläre N-Terminus der Ligandenbindung und der intrazelluläre C-Terminus der Kopplung an G-Proteine zur Signalweiterleitung dient (Laburthe et al., 2007). Alle PACAP-Rezeptoren interagieren mit der G-Protein-Untereinheit $G\alpha_s$ und induzieren über die Aktivierung der AC einen intrazellulären Anstieg von cAMP mit anschließender Aktivierung der PKA (Inagaki et al., 1994, Martin et al., 1995, Cai et al., 1997, Grimaldi and Cavallaro, 1999). Zudem verfügen alle Rezeptoren durch verschiedene Signalwege (siehe Abb. 1.2.3) über die Möglichkeit zur Aktivierung weiterer Effektoren wie den Phospholipasen C und D (PLC, PLD) (McCulloch et al., 2000) und der Proteinkinase C (PKC) (Dickson and Finlayson, 2009). Die Wirkung von PACAP auf die Zelle, z.B. die Veränderung der Genexpression oder die Exozytose von Signalstoffen, wird im Anschluss durch die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration sowie der Phosphorylierung verschiedener Zielproteine durch die Kinasen PKA und PKC vermittelt.

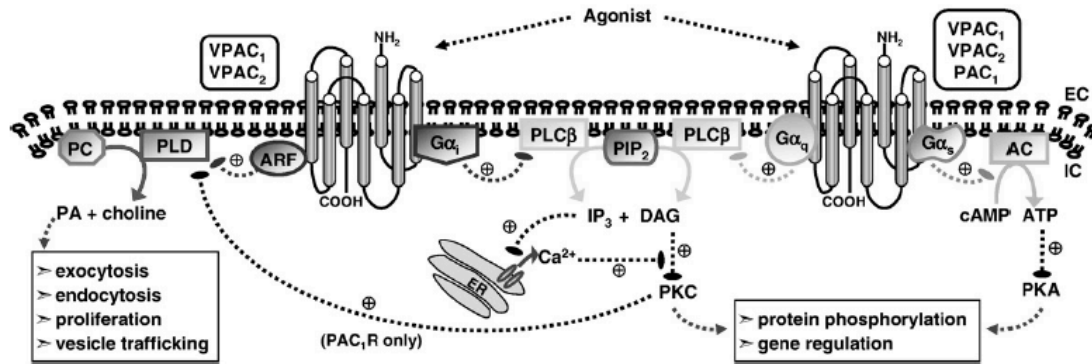


Abb. 1.3.3: Intrazelluläre Signalwege der PACAP-Rezeptoren. Am häufigsten ist eine Kopplung aller drei Rezeptor-Typen mit $G\alpha_s$, dessen Aktivierung in einer Erhöhung der Aktivität der Adenylatzyklase (AC) und damit des cAMP-Spiegels resultiert, der wiederum die Proteinkinase A (PKA) aktiviert. Es findet sich bei allen Rezeptoren eine Kopplung mit $G\alpha_q$, und damit den G-Proteinen, die über Aktivierung der Phospholipase C beta (PLC β) die Spaltung von Phosphoinositolbisphosphat (PIP₂) in Inositoltrisphosphat (IP₃) und Diaminoglycerol (DAG) und eine Kalziumfreisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum induzieren. Über die Kopplung mit ARF (VPAC₁ und VPAC₂) beziehungsweise der Proteinkinase C (PKC, PAC₁-R) verfügen alle Rezeptoren außerdem über die Möglichkeit einer Induktion der Phospholipase D (PLD). Aus: (Dickson and Finlayson, 2009)

Während für die Rezeptorbindung vor allem der C-Terminus, für die Rezeptoraktivierung jedoch der N-Terminus des Liganden von entscheidender Bedeutung ist (Onoue et al., 2001, siehe Abb. 1.3.4.), fungieren N-terminal trunkierte Peptide wie z.B. PACAP₆₋₃₈ als selektive Antagonisten der PACAP-Rezeptoren (Robberecht et al., 1992). Umgekehrt genügt allerdings das N-terminale Tripeptid Glycin (G), Isoleucin (I) und Phenylalanin (F) (GIF, siehe Abb. 1.3.4) zur Aktivierung des PAC₁-R und fungiert somit als ein selektiver PAC₁-R Agonist (Yang et al., 2006a). Aufgrund der geringen Halbwertszeit von PACAP ist es außerdem denkbar, dass auch dessen Abbauprodukte an der Signalübertragung beteiligt sind (Bourgault et al., 2008).

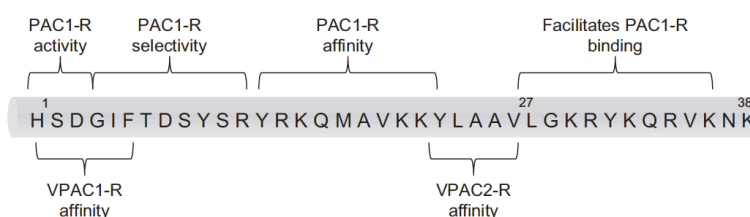


Abb. 1.3.4: Funktionell wichtige Sequenzbereiche von PACAP. Gezeigt ist die Peptidsequenz mit Markierung der für die Affinität, Selektivität und Aktivierung der verschiedenen PACAP-Rezeptoren entscheidenden Bereiche. Aus: Vaudry et al., 2009)

Einige Effekte, die nach PACAP-Stimulation verschiedener Zelltypen beobachtet wurden, wurden bereits von subpicomolaren Konzentrationen (ca. 10^{-13} M) induziert (Morio et al., 1996, Nakamachi et al., 2006, Yang et al., 2006a), während eine Erhöhung von intrazellulärem Kalzium und/oder cAMP erst ab nanomolaren Konzentrationen zu beobachten ist (Onoue

et al., 2002a, Nakamachi et al., 2006). Entsprechend werden noch andere, cAMP- und Kalzium-unabhängige Signalwege, unter Umständen sogar eine zusätzlich zu den bekannten Rezeptoren existierende, hochaffine Bindungsstelle für PACAP diskutiert (Yang et al., 2006a). Des Weiteren sind Interaktionen der PACAP-Rezeptoren mit den sogenannten RAMPs (*receptor affinity modifying proteins*, siehe 1.2.2) gezeigt worden (Christopoulos et al., 2003), insbesondere eine Interaktion zwischen VPAC1 und RAMP2 (Laburthe et al., 2002). Dabei kommt es weder zu einer Veränderung der Ligandenaffinität noch der Aktivierung des AC/cAMP/PKA-Signalwegs, allerdings konnte eine gesteigerte Aktivität der PLC beobachtet werden (Christopoulos et al., 2003).

Da PACAP und VIP geringe Halbwertszeiten besitzen, sind die Signalwege meist autokriner oder parokriner Natur, so dass sich das Expressionsprofil der Rezeptoren in der Peripherie sowie dem ZNS weitgehend mit dem ihrer Liganden deckt (Vaudry et al., 2000, Dickson and Finlayson, 2009). Dabei ist jedoch zu bemerken, dass im Gegensatz zu VPAC1 und VPAC2 der PAC1-R fast ausschließlich im Gehirn exprimiert ist (Hashimoto et al., 1993, Ogi et al., 1993, Joo et al., 2004) und dort vor allem in der Entwicklung eine große Rolle spielt (Jaworski and Proctor, 2000). Neben Neuronen, die alle drei Rezeptoren exprimieren (Grimaldi and Cavallaro, 1999, Brenneman, 2007), besitzen auch Gliazellen einen spezifischen Besatz. So exprimieren sowohl ruhende als auch aktivierte Astrozyten VPAC1, VPAC2 und PAC1 (Grimaldi and Cavallaro, 1999, Suzuki, 2003, Joo et al., 2004), während Mikroglia nur VPAC1 und PAC1-R (Kim et al., 2000, Delgado et al., 2002) und Oligodendrozyten ausschließlich PAC1-R exprimieren (Joo et al., 2004). Vor allem im Falle von PAC1-R unterscheiden sich die Zelltypen noch einmal durch die Expression unterschiedlicher *Splice*-Varianten (Jaworski, 2000, Zhou et al., 2000, Stumm et al., 2007).

1.3.3 Physiologische Funktionen

Durch seine weite Verbreitung im Organismus und die vielfältigen Signalwege handelt es sich bei PACAP um ein pleiotropisches Peptid mit zahlreichen Funktionen als Neurotransmitter, Neuromodulator, neurotropher Faktor sowie als Vasodilator und Immunomodulator (für eine detaillierte Übersicht siehe Vaudry et al., 2009). Im ZNS spielt PACAP vor allem durch seinen spezifischen Rezeptor PAC1-R eine äußerst wichtige Rolle bei der Neuroprotektion (siehe unten) sowie während der Gehirnentwicklung (Jaworski and Proctor, 2000, Shioda, 2006). Dabei fördert PACAP die Proliferation neuraler Vorläuferzellen (Hashimoto et al., 2003), übt insbesondere im Kleinhirn hemmende Effekte auf die Apoptose und die Zell-

migration aus (Botia et al., 2007) und induziert die Differenzierung neuraler Stammzellen in Astrozyten (Ohno et al., 2005).

Inzwischen wurden verschiedene PACAP-defiziente (Hashimoto, 2001, Hamelink et al., 2002) sowie PAC1-R-defiziente Mausstämme (Jamen et al., 2000, Otto et al., 2001) entwickelt, deren Phänotypen die zahlreichen Funktionen von PACAP widerspiegeln. So weisen die Tiere Defizite im Energiestoffwechsel, der Stressantwort und der Fertilität auf, zeigen Veränderungen der psychomotorischen Aktivität, des zirkadianen Rhythmus und in der neuronalen Entwicklung sowie den Verlust von inflammatorischem und neuropathischem Schmerz (für eine detaillierte Übersicht siehe Hashimoto, 2006).

1.3.3.1 PACAP als potenter neuroprotektiver Faktor

Neben seiner protektiven Wirkung während der Gehirnentwicklung übt PACAP auch im adulten Tier nach Verletzung, ischämischen Schäden oder während degenerativer Erkrankungen verschiedene überlebensfördernde Effekte auf Neuronen aus (Übersicht siehe Shioda, 2006). Neben der direkten Wirkung an Neuronen fallen dabei insbesondere *in vivo* auch die indirekten Effekte über die Modulation der Gliareaktionen ins Gewicht, wo PACAP wie in der Peripherie vor allem anti-inflammatorische Effekte ausübt (Leceta et al., 2000).

1.3.3.2 *In vitro*-Effekte an Neuronen

PACAP reduziert sowohl in PC12-Zellen nach Kalium- oder NFG-Deprivation als auch in cerebellaren Neuronen unter H₂O₂-induziertem oxidativem Stress die Apoptoserate (Vaudry et al., 2002). Auch bei der Akkumulation und Aggregation von β -Amyloid, Ceramid und des Prion-Proteins in PC12-Zellen, die *in vitro*-Modelle für Morbus Alzheimer und die Kreutzfeld-Jakob-Krankheit darstellen, wurde unter PACAP-Applikation eine geringere Sterblichkeit beobachtet (Uchida et al., 1996, Onoue et al., 2002a, Onoue et al., 2002b, Vaudry et al., 2003). Vielfach beschrieben ist der schützende Effekt von PACAP gegen die Glutamat-induzierte Erregungstoxizität an corticalen und hippocampalen Neuronen, retinalen Neuronen und PC12-Zellen sowie bei Motoneuronen (Morio et al., 1996, Shoge et al., 1999, Onoue et al., 2002b, Tomimatsu and Arakawa, 2008). Allen Experimenten gemeinsam war dabei der Anstoß der AC/cAMP/PKA-Signalkaskade mit einer anschließenden Reduzierung der MAPK- und Caspase-3-Aktivität. PACAP scheint auf Neurone also einen generellen, anti-apoptotischen Effekt auszuüben (Shioda, 2006).

1.3.3.3 *In vitro*-Effekte an Astrozyten

Mehrere Studien konnten zeigen, dass PACAP die Differenzierung neuraler Vorläufer in GFAP-positive Zellen forciert (Tatsuno et al., 1994, Cebolla et al., 2008, Lastres-Becker et al., 2008), und auch an adulten Astrozyten wurden durch PACAP induzierte Effekte beschrieben. So steigert PACAP z.B. die Expression der glialen Glutamat-Transporter EAAT2, des IL-6 sowie die Ausschüttung neurotropher Faktoren (Gottschall et al., 1994, Figiel and Engele, 2000, Stumm et al., 2007). Zu bemerken ist dabei, dass die Signalwege fast ausschließlich über den PAC-1 Rezeptor angestoßen werden und Astrozyten schon auf wesentlich geringere PACAP-Konzentration mit einem Anstieg der cAMP-Level reagieren als Neurone (Figiel and Engele, 2000, Nowak et al., 2007, Stumm et al., 2007).

1.3.3.4 *In vitro*-Effekte an Mikroglia

Auf Mikroglia übt PACAP vor allem anti-inflammatorische Effekte aus, indem es z.B. den Transkriptionsfaktor NFκB inhibiert und damit die Freisetzung pro-inflammatorischer Substanzen (MIP 1 und 2, RANTES, Delgado et al., 2002) reduziert. In LPS- oder IFNγ-aktivierten Mikroglia führt PACAP über eine Inhibition der MAPK zur Abschwächung der iNOS-Aktivität und damit der NO-Freisetzung, außerdem wird die Freisetzung des pro-inflammatorischen Zytokins IL-6 verringert (Lee and Suk, 2004). Eine weitere Studie zeigte sogar eine vollständige Unterdrückung der TNFα-Produktion LPS-stimulierter Mikroglia durch PACAP (Kim et al., 2000). Bemerkenswert ist ebenso die Beobachtung, dass PACAP über einen hochaffinen, von den klassischen Rezeptoren unabhängigen Signalweg die Aktivität der NADPH-Oxidase hemmt (Yang et al., 2006b).

1.3.3.5 Neuroprotektive Effekte *in vivo*

PACAP ist in vielen Fällen neuraler Schädigung reguliert, z.B. zeigen sowohl sensorische als auch motorische Neurone in Hirnstamm oder Rückenmark/Hinterwurzelganglien als Reaktion auf faciale oder spinale Axotomie eine erhöhte Hochregulation der PACAP-Expression (Zhang et al., 1996, Pettersson et al., 2004a). Eine andere Studie konnte zeigen, dass die Deletion des endogenen PACAP zu einer deutlichen Erhöhung der (Moto)Neuronendegeneration nach Rückenmarksläsion führte, während die Gabe von exogenem PACAP bei identischer Verletzung zu einem deutlich verringerten Läsionsvolumen führte (Chen and Tzeng, 2005). Während in diesem Fall PACAP in die Wunde appliziert wurde, kann PACAP aufgrund seiner guten Permeabilität durch die Blut-Hirn-Schranke (Banks et al., 1996, Somogyvari-Vigh et al., 2000) auch intravenös appliziert und der neuroprotektive Effekt in verschiedenen Tier-

modellen untersucht werden. So führt die intravenöse Gabe von PACAP zu einer deutlichen Reduktion des Infarkt Volumens nach Ischämie (Reglodi et al., 2000, Reglodi et al., 2002); auch dann, wenn die Applikation erst eine Stunde nach der Arterienokklusion erfolgte (Chen et al., 2006). Analog dazu resultierte auch die regelmäßige Gabe von PACAP in zwei Tiermodellen des Morbus Parkinson zu einer deutlichen Verbesserung der motorischen Symptomatik (Reglodi et al., 2004, Reglodi et al., 2006a, Wang et al., 2008).

Wie sich aus der Beobachtung, dass PACAP-defiziente Tiere ein wesentlich größeres Infarktvolumen aufweisen (Chen et al., 2006), schließen lässt, ist zumindest im Fall der Ischämie auch endogenes PACAP an der Protektion geschädigter Neurone beteiligt. Allerdings wurde in keinem der Fälle eindeutig untersucht, ob die PACAP-vermittelten neuroprotektiven Effekte aus der anti-apoptotischen Wirkung an Neuronen oder der anti-inflammatorischen Wirkung auf Gliazellen resultierten.

1.4 Zielsetzungen der vorliegenden Arbeit

Bisher wurde die Beteiligung von Neuropeptiden an der Pathogenese der ALS nicht bzw. nur in der dieser Arbeit vorangegangenen Diplomarbeit (siehe Ringer et al., 2009) untersucht, obwohl sowohl CGRP als auch PACAP i) in Motoneuronen exprimiert werden, ii) als potenziell neuroprotektive Faktoren bekannt sind, iii) vor allem anti-inflammatorische Effekte ausüben und iv) sich Agonisten bzw. Antagonisten schon in Therapieansätzen bei anderen Krankheiten bewährt haben. Deshalb sollte geklärt werden, (i) ob, und wenn ja, welchen Einfluss die beiden Peptide im SOD1-Mausmodell auf die Symptomentwicklung der ALS haben und (ii) auf welchen molekularen Mechanismus beziehungsweise histopathologischen Effekt sich diese Veränderungen zurückführen lassen, um (iii) beurteilen zu können, ob sich agonistische bzw. antagonistische Interventionen in entsprechende Signalkaskaden als Therapieansatz für die ALS eignen könnten. Aufgrund der unterschiedlichen Vorarbeiten bzw. dem Stand der Literatur ergab sich folgende konkrete Vorgehensweise:

1.4.1 Aufklärung der Rolle von CGRP in der ALS

Effekte einer α CGRP-Deletion auf den Krankheitsverlauf im SOD1-Mausmodell

Um zu überprüfen, ob α CGRP tatsächlich neuroprotektive Effekte in den Motoneuronen ausübt und damit auch einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf der ALS hat, wurde bereits während der vorangegangenen Diplomarbeit mit der Einkreuzung eines α CGRP-defizienten Mausstammes in das SOD1-Mausmodell begonnen. In der vorliegenden Arbeit erfolgte anschließend die klinisch-symptomatische Untersuchung der relevanten Test- und Kontrollgruppen. Falls sich Effekte in der Symptomatik zeigten, sollten deren Ursachen (z.B. Veränderungen der Neurodegeneration, Neuroinflammation, Denervierung der Muskelfasern) auf histologischer Ebene ermittelt werden.

Charakterisierung der CGRP-Immunoreaktivität im Gehirn

Analog der vorangegangenen Studie im Rückenmark (Ringer et al., 2009), sollte die CGRP-Immunoreaktivität bezüglich ihres zeitlichen Verlaufs, der intrazellulären und regionalen Lokalisation und der Assoziation mit aktivierten Astrozyten untersucht werden. Im Vordergrund standen dabei die motorischen Kernareale im Hirnstamm (sekundäre Motoneurone) sowie der Motorkortex (primäre Motoneurone); nicht-motorische Areale wurden jedoch nicht ausgeschlossen.

Effekte einer RAMP1-Deletion auf den Krankheitsverlauf im SOD1-Mausmodell

Da die vorangegangene Arbeit nicht nur Hinweise auf eine neuroprotektive Funktion der α -Isoform des CGRP, sondern auch auf eine neuropathologische Rolle des β CGRP lieferte, sollte in der vorliegenden Arbeit auch diese Hypothese *in vivo* überprüft werden. Da bisher jedoch kein β CGRP-Knockout-Stamm etabliert ist, wurde stattdessen auf die Einkreuzung einer Deletion der CGRP-Rezeptorkomponente RAMP1 in das SOD1-Mausmodell zurückgegriffen, durch die die CGRP-Signalkaskade vollständig unterbrochen wird. Sofern CGRP unabhängig der Isoform eine entscheidende Rolle im Krankheitsverlauf spielt, sollte sich die Symptomentwicklung der SOD1-Mäuse mit RAMP1-Deletion verändern. Verkürzt sich der Krankheitsverlauf und damit die Überlebensrate, hat CGRP einen insgesamt neuroprotektiven Effekt in der ALS, verlängern sich Symptomentwicklung und Überlebensdauer, übt CGRP insgesamt einen negativen Einfluss auf die Krankheitsprogression aus. Falls sich Effekte in der Symptomatik zeigten, sollten deren Ursachen (z.B. Veränderungen der Neuroinflammation, Neurodegeneration, Denervierung der Muskelfasern) auf histologischer Ebene ermittelt werden.

Im Zuge der Untersuchung der Krankheitssymptomatik sollten neben der bereits angewandten Dokumentation der Entwicklung des Körpergewichts und des Überlebens sowie dem PaGE-Test für die Kraftausdauer der Hinterpfoten auch ein Test zur Griffstärke der Vorderpfoten und der Zungenmotorik etabliert werden, um sowohl besser zwischen verschiedenen Kraftmodalitäten (Ausdauer versus Schnellkraft) als auch Motoneuronengruppen (spinal *versus* cranial) unterscheiden zu können.

Expressionsprofile der CGRP-Rezeptorkomponenten in der ALS-Pathogenese

In der vorangegangenen Studie wurden zwar die Expressionsprofile von α - und β CGRP untersucht und keine Unterschiede zwischen gesunden Motoneuronen in Wildtyptieren und geschädigten Motoneuronen in SOD1-transgenen Tieren verschiedener Stadien gefunden. Doch schließt das nicht aus, dass alternativ die Rezeptoren reguliert sind oder deren Expression gar erst induziert wird, was in der vorliegenden Arbeit untersucht werden sollte.

1.4.2 Aufklärung der Rolle von PACAP in der ALS

Expressionsprofile von PACAP und seiner Rezeptoren in der ALS-Pathogenese

In dieser Arbeit sollte geklärt werden, welche Zelltypen PACAP exprimieren beziehungsweise welchen Besatz an PACAP-Rezeptoren (PAC1, VPAC1 und VPAC2) sie aufweisen und ob sich dieses Expressionprofil im Zeitverlauf der ALS ändert. Aufgrund der Beobachtung in anderen Formen der neuronalen Schädigung ist eine Induktion bzw. Hochregulation von PACAP in den Motoneuronen wahrscheinlich.

Effekte einer PACAP-Deletion auf den Krankheitsverlauf im SOD1-Mausmodell

Um zu klären, ob und wenn ja welche Rolle endogenes PACAP bei der ALS-Pathogenese spielt, sollte ein PACAP-defizienter Mausstamm in das SOD1-Mausmodell eingekreuzt und der Krankheitsverlauf untersucht werden. Aufgrund der vielfach beschriebenen neuroprotektiven Funktionen von PACAP wird erwartet, dass sich der Krankheitsverlauf der SOD1-Mäuse unter der PACAP-Deletion beschleunigt und sich die Überlebensrate reduziert.

Sowohl die Dokumentation der klinischen Symptomatik als auch die Aufklärung histopathologischer Effekte sollte analog der Untersuchung des RAMP1-Knockouts im SOD1-Mausmodell (siehe oben) verlaufen.

2 Material und Methoden

Der Übersicht halber erfolgt hier zunächst die Beschreibung der angewandten Methoden mit den wichtigsten Angaben zu den benutzten Materialien; eine genau Auflistung der Zusammensetzung verwendeter Puffer und Lösungen sowie Herstellerangaben zu Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräten finden sich im Anschluss (siehe 2.8 und 2.9).

2.1 Versuchstiere

2.1.1 Verwendete Mausstämme

Alle Tiere wurden zusammen mit maximal 4 gleichgeschlechtlichen Geschwistern desselben Wurfes in Standardkäfigen mit freiem Zugang zu angesäuertem Wasser und ausreichend Trockenfutter gehalten. Der Tag-Nacht-Rhythmus betrug konstant 12h, die Raumtemperatur 21°C und die Luftfeuchtigkeit 60-70%. Bei neuen Würfen erfolgte Absetzen, Markieren und Abnehmen der Ohrstanze zur Genotypisierung (siehe 2.1.2) am postnatalen Tag 19-21.

Genehmigungen für Haltung und Züchtung der Tiere sowie alle im Folgenden beschriebenen Tierversuche durch das Regierungspräsidium des Landes Hessens lagen vor (Kennzeichen: V54-19c20-15(1) MR 20/26-Nr. 65/2007 sowie V54-19c20-15(1) MR 20/26-Nr. 48/2010).

2.1.1.1 SOD1-transgener Mausstamm

Bei den von Jackson Laboratories (Bar Harbor, USA) bezogenen Mäuse des Stamms B6SJL-TgN(SOD1-G93A)1Gur handelt sich um ein etabliertes Tiermodell zum Studium der Pathogenese der ALS (Gurney, 1994), für eine vergleichende Übersicht siehe Shibata, 2001, Julien and Kriz, 2006). Die Tiere tragen in hoher Kopienzahl eine pathogene Variante (G93A) der humanen SOD1, aus der heraus sich bei heterozygoten Tieren durchschnittlich am postnatalen Tag 90 (P90) Symptome wie Lähmungserscheinungen und Gewichtsverlust entwickeln. Aufgrund eines wesentlich schnelleren Krankheitsverlaufs wurden keine homozygot transgenen Tiere verwendet, außerdem sind SOD1 transgene Weibchen unfruchtbar, so dass die Aufrechterhaltung der Zucht sowie das Einkreuzen des SOD1^{G93A} Allels in andere Mausstämme (siehe unten) ausschließlich über SOD1^{G93A} Männchen mit SOD1^{wt}-Weibchen erfolgte.

Die Lebenserwartung beträgt 120-140 Tage, aus ethischen Gründen wurden die Tiere jedoch getötet, sobald sie das Endstadium der Krankheit erreichten, d.h. nur noch 80% ihres Aus-

gangsgewichtetes (ermittelt an P40) besaßen und/oder nicht mehr dazu in der Lage waren, sich auf die Pfoten zu drehen, nachdem sie auf die Seite gelegt wurden. Um eine ausreichende Ernährung der Tiere zu gewährleisten, wurde ihnen mit Beginn der Symptomatik in Wasser eingeweichtes Futter auf den Boden des Käfigs gelegt und Wasserflaschen so postiert, dass auch stark gelähmte Tiere sie noch erreichen konnten.

2.1.1.2 RAMP1 defizienter Mausstamm

Generiert und charakterisiert wurde der RAMP1 defiziente Mausstamm von Prof. Tsujikawa (Tsujikawa et al., 2007, siehe auch Harzenetter et al., 2007, und Altmayr et al., 2010), von diesem bezogen und auf einem C57BL/6-Hintergrund erhalten. Im Zuge der eigenen Untersuchung erfolgte außerdem eine Einkreuzung des RAMP1 defizienten Mausstammes in den oben beschriebenen SOD1-transgenen Stamm. Dafür wurden zunächst SOD1^{G93A} Männchen mit RAMP1^{-/-} Weibchen verpaart. Unter den Nachkommen (F1-Generation) wurden RAMP1^{+/-}/SOD1^{G93A} Männchen mit RAMP1^{+/-}/SOD1^{wt} Weibchen verpaart. Aus der erhaltenen F2-Generation wurden folgende vier Genotypen zur vergleichenden Untersuchung von Test- und Kontrollgruppen benötigt: RAMP1^{-/-}/SOD1^{G93A} (RAMP1-SOD1), RAMP1^{+/+}/SOD1^{G93A} (WT-SOD1), RAMP1^{-/-}/SOD1^{wt} (RAMP1-WT) und RAMP1^{+/+}/SOD1^{wt} (WT-WT).

2.1.1.3 αCGRP defizienter Mausstamm

Die αCGRP-Knockout-Mäuse (charakterisiert durch Salmon et al., 1999) wurden von Prof. J.P. Changeux (Institute Pasteur, Paris, Frankreich) bezogen und auf einem C57BL/6-Hintergrund erhalten. Im Rahmen des Gesamtprojekts erfolgte eine Einkreuzung des αCGRP-Knockouts in den oben beschriebenen SOD1-transgenen Stamm und eine Charakterisierung bezüglich der Auswirkungen der Deletion auf den Krankheitsverlauf der ALS (Ringer et al., 2009).

2.1.1.4 βCGRP defizienter Mausstamm

Zwei Zuchtpaare mit heterozygot deletiertem βCGRP Allel wurden vom Texas A&M Institute for Genomic Medicine (College Station, Texas, USA) bezogen. Die homozygoten Tiere der F1 Generation wurden sukzessive auf einen C57BL/6-Hintergrund rückgekreuzt und anschließend in homozygoter Zucht als βCGRP defizienter Mausstamm etabliert. Die Verifizierung der βCGRP-Defizienz erfolgte sowohl auf Proteinebene durch Immunhistochemie (siehe 2.6) als auch auf mRNA-Ebene durch *in situ*-Hybridisierung (siehe 2.7)

2.1.1.5 PACAP defizienter Mausstamm

Der PACAP defiziente Mausstamm (Hamelink et al., 2002) wurde bezogen von Prof. Lee Eiden (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA), auf einem C57BL/6-Hintergrund erhalten und für das dargestellte Projekt in den SOD1 transgenen Mausstamm eingekreuzt. Verfahren wurde nach demselben Prinzip wie bei den RAMP1-Tieren (siehe oben) mit Erhalt folgender relevanten Gruppen aus der F2-Generation: PACAP^{-/-}/SOD1^{G93A} (PACAP-SOD1), PACAP^{+/+}/SOD1^{G93A} (WT-SOD1), SOD1^{wt} (PACAP-WT) und PACAP^{+/+}/SOD1^{wt} (WT-WT). Da neugeborene PACAP^{-/-}-Mäuse temperaturempfindlich sind (Gray, 2002, Adams et al., 2008), wurde in Zeiträumen der Nachzucht und der Einkreuzung in den SOD1-Mausstamm die Temperatur auf 24°C heraufgesetzt.

2.1.2 Genotypisierung

Um den jeweiligen Genotyp der Tiere festzustellen wurde aus den beim Absetzen genommenen Ohrstanzen die genomische DNA extrahiert (siehe 2.5.1.1). Mittels Allel-spezifischer *Primer* erfolgte die Ermittlung des Genotyps durch PCR (siehe 2.5.1.7). Die bei der anschließenden Gelelektrophorese (siehe 2.5.1.8) entstehenden Bandenmuster erlaubten einen zweifelsfreien Rückschluss auf die zugrundeliegenden Genotypen. Es wurden folgende Primerkombinationen verwendet:

Tabelle 2.1.2: Zur Genotypisierung der Mausstämmen verwendete Primerpaarungen und –sequenzen

Stamm	Primer-ID	Primer-Sequenz (5'-3')	Produktgröße / Allel-ID	T(A)
SOD1	SOD1-wt-F	CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT	324bp (Basenpaare)	60°C
	SOD1wt-R	CTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C	SOD1-Wildtyp	
	SOD1tg-F	CAT GAG CCC TAA TCC ATC TGA	236bp	
	SOD1tg-R	CGC GAC TAA CAA TCA AAG TGA	SOD1-Transgen	
RAMP1	RAMP1-F	CAG ATT GGA GAA ACT GAG AGA GC	108bp / RAMP1-Wildtyp 240bp / RAMP1-Knockout	60°C
	RAMP1wt-R	AGG AAG GAA CGT AAC ACA GGT GG		
	RAMP1ko-R	GCT GTG CGT GGT GAT GGA GG		
αCGRP	aCGRPwt-F	CAT CCC CCT CCC ACT GC	200bp	60°C
	aCGRPwt-R	GCC TGA AGG TCC CTG CG	aCGRP-Wildtyp	
	aCGRPko-F	CCC CAT CCT GAA TAT CAG TGT CA	300bp	
	aCGRPko-R	GCC TGA AGG TCC CTG CG	aCGRP-Knockout	
βCGRP	TG0114-26	TAC TGC ACG GTT TTG AGA AGC TGC AGT G	402bp	64°C
	GT-IRES	CCC TAG GAA TGC TCG TCA AGA	bCGRP-Wildtyp	
	TG0114-13	TTT AAC CTG CTG ACT GCC GTA AGA	346bp	
	TG0114-14	GGG CCA CTG ATT CTC CGA CA	bCGRP-Knockout	
PACAP	Neo-O-F	CAC CGG CCT TTA GGG ACC CTT GTA	520bp / PACAP-Wildtyp 310bp / PACAP-Knockout	62°C
	PACAP-2-R	GCT ATT CGG CGT CCT TTG TTT TTA ACC C		
	PNT-1-R	TAG GGG AGG AGT AGA AGG TGG GCG		

PCR-Ansatz:	Reagenz	Menge	Zyklusfolge:	Temperatur	Zeit	Wdh.
	gDNA	1µl		94°C	5min	1x
	10x Puffer	2µl		94°C	30sec	35x
	dNTPs	0,5µl		T(A)	30sec	
	Primer	je 0,2µl		72°C	1min	
	Red Taq	1µl		72°C	5min	1x
	Reinstwasser	ad 20µl		8°C	∞	

2.1.3 Dokumentation des Krankheitsverlaufes SOD1-transgener Tiere

Um Beginn und Verlauf der durch die eingefügte SOD1-Variante induzierten Symptome und deren eventuelle Veränderung durch verschiedene Gen-Deletionen (siehe 2.1.1) festzustellen, wurden transgene Tiere mit und ohne den jeweiligen Knockout und zur Kontrolle auch Wildtyp-Tiere gleichen Alters wöchentlichen Untersuchungen unterzogen. Zur Gewährleistung statistisch aussagekräftiger Ergebnisse wurden 15-20 Tiere pro Gruppe untersucht, die genauen n-Zahlen sind an entsprechenden Stellen des Ergebnisteils angegeben. Neben der Dokumentation der Überlebensrate und Messung des Körpergewichts wurden zudem die im Folgenden beschriebenen Tests verschiedener motorischer Funktionen durchgeführt. Die Untersuchungen wurden begonnen am postnatalen Tag (P) 30 und so lange fortgesetzt, bis alle transgenen Tiere das Endstadium (siehe 2.1.1.1) erreicht hatten und getötet wurden.

2.1.3.1 Paw Grip Endurance (PaGE) Test

Der PaGE-Test (Weydt et al., 2003, Schütz, 2005) diente dazu die Kraftausdauer der Hinterpfoten zu ermitteln: Die Tiere wurden einzeln auf ein ca. 40 Zentimeter über einem Tisch installiertes Gitternetz gesetzt. Nachdem die Tiere einen Griff gefunden hatten, wurde das Gitter um 180° gedreht und die Zeit ermittelt, bis die kopfüber hängenden Mäuse mit beiden Hinterpfoten das Gitter losließen. Die maximale Dauer betrug 120 Sekunden, ließ ein Tier früher los, wurde der Test nach einer kurzen Pause, in der sich die Tiere bzw. deren Muskeln von der Anstrengung erholen konnten, wiederholt. Erreichte das Tier auch beim dritten Mal die Maximalzeit nicht, wurde die längste erreichte Zeitspanne als endgültiger Messwert erfasst.

2.1.3.2 Grip Strength Test

Mit dem *Grip Strength* Test (Griffstärke) wurde die Maximalkraft der Vorderpfoten erfasst. Die Tiere wurden am Schwanz gegriffen und mit der Schnauze dicht vor einen an einer Federwaage befestigten Metallbügel gehalten. Sobald das Tier mit den Vorderpfoten den Bügel fest umgriffen hatte, wurde es zügig nach hinten weggezogen, bis es der Zugkraft der Federwaage nicht mehr Stand halten konnte und den Bügel losließ. Der Ausschlag der Federwaage zum Zeitpunkt des Loslassens entspricht dabei der maximal von den Vorderpfoten aufgebrauchten Kraft. Als Messwert erfasst wurde der höchste Wert von drei Wiederholungen des Testes nach kurzen Pausen, in denen sich die Tiere bzw. die beanspruchten Muskeln erholen konnten.

2.1.3.3 Licking Test

Der Leck-Test basiert auf dem für Mäuse typischen rhythmischen Leckreflex, dessen Frequenz sich mit der ALS-Symptomatik verlangsamt (Hayar et al., 2006). Dabei wurden die Mäuse in einen Käfig gesetzt, dessen Metallboden elektrisch mit dem ebenfalls leitfähigen Schnabel der Wasserflasche verbunden ist. Beim Trinken erzeugten die Tiere mit jedem Lecken eine kurze, für sie nicht zu spürende Kontaktspannung. Die entstehenden Spannungsspitzen liefen über einen Verstärker und wurden von einer Software aufgezeichnet. Aus einer ununterbrochenen Leckphase wurden die Abstände von 25 Spannungsspitzen (entsprechen einzelnen Leckvorgängen) errechnet, gemittelt und in eine durchschnittliche Leckfrequenz (*licks* pro Sekunde [Hz]) umgewandelt.

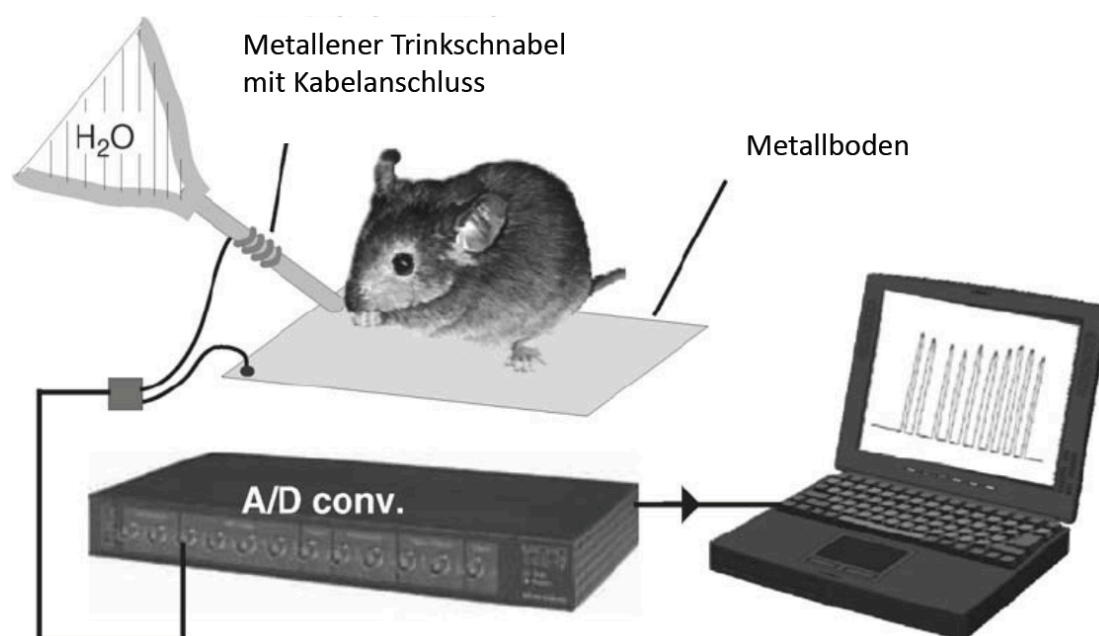


Abb. 2.2.1: Schematische Darstellung der Apparatur des Lecktests. Die Maus sitzt in einem Käfig mit Metallboden. Wenn sie mit der Zunge den metallenen Trinkschnabel berührt, schließt sich der Stromkreis und es fließt eine für die Maus nicht zu spürende Spannung. Ein Analog-Digital-Wandler (A/D conv.) konvertiert die analog gemessene Spannung in digitale Impulse, die von einem Computer aufgezeichnet werden. Die Abstände der mit jedem einzelnen Lecken entstehenden Spannungsspitzen können im Anschluss als Frequenz ausgewertet werden.

Um den Tieren einen zusätzlichen Anreiz zum schnellen und kontinuierlichen Lecken zu geben, wurde ihnen statt Wasser gesüßte Milch (3,5% v/v Fett mit 5% w/v Saccharose) geboten. Bei Tieren, die aufgrund fortgeschrittener ALS-Symptomatik keine 25 zusammenhängenden Leckvorgänge mehr zeigten, wurden Trinkpausen in der Auswertung übersprungen und 25 Werte aus einzelnen Abständen zwischen zwei Leckvorgängen gemittelt.

2.1.4 Statistische Analyse

Die Berechnung von Mittelwerten und Standardabweichungen erfolgte durch die Kalkulationssoftware Exel (Microsoft), statistische Analysen sowie die anschließende graphische Darstellung mittels der Spezialsoftware Prism (GraphPad). Die Dokumentation und Analyse der Überlebensraten erfolgte nach dem Kaplan-Meier-Prinzip, alle anderen Parameter wurden über eine zweifaktorielle ANOVA (analysis of variance) mit den Faktoren ALTER und GENOTYP und anschließendem Bonferroni-Posttest auf signifikante Unterschiede untersucht. Es galten die allgemeinen Signifikanzniveaus von $p < 0,5$ = signifikant, $p < 0,01$ = hochsignifikant und $p < 0,001$ = höchstsignifikant.

2.2 Gewebepreparation

Die Betäubung und anschließende Tötung der zu präparierenden Tiere erfolgte durch eine Überdosis an Isofluran-Inhalation und anschließender Eröffnung des Brustkorbes, um den sicheren Tod des Tieres durch den entstehenden Pneumothorax zu gewährleisten. Nach Ausblutung des Tieres durch Eröffnung des Herzens erfolgten Entnahme und die der gewünschten Fixierung entsprechende Weiterbehandlung der Gewebe.

2.2.1 Fixierung

2.2.1.1 Bouin Hollande Fixierung

Die entnommenen Gewebe wurden in frisch angesetzte Bouin Hollande Lösung gegeben und 2 Tage bei Raumtemperatur auf dem Schüttler fixiert. Nach gründlicher Auswaschung der Fixanzlösung mit 70% Isopropanol erfolgte im TissueTek-Einbettautomaten die Überführung in Paraffin (je 1h 70%, 80%, 96%, 3x100% Isopropanol und 3x Xylol bei 40°C, 3x1h Paraffin bei 60°C). Anschließend wurden die Präparate an der TissueTek-Ausbettstation in gewünschter Orientierung in Paraffinblöcke eingegossen und nach Aushärtung bis zur weiteren Verarbeitung bei Raumtemperatur gelagert.

2.2.1.2 Fixierung in Paraformaldehyd (PFA)

Die entnommenen Gewebe wurden in frisch angesetzte PFA-Lösung gegeben und 2 Tage bei Raumtemperatur auf dem Schüttler fixiert, danach in Succrose-Lösung überführt und weitere 2 Tage auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend erfolgte die Einbettung der fixierten Gewe-

be in TissueTek O.T.C. und Gefrieren in ca. -40°C kaltem Isopentan. Nach Aushärtung des TissueTek O.T.C. und Abdampfen des Isopentans auf Trockeneis wurden die gefrorenen Gewebelöcke bis zur Weiterverarbeitung bei -70°C gelagert.

2.2.1.3 Asservierung von Kryogewebe

Die entnommenen Gewebe wurden in TissueTek O.T.C. eingebettet und in -40°C kaltem Isopentan gefroren. Nach Aushärtung des TissueTek O.T.C. und Abdampfen des Isopentans auf Trockeneis wurden die gefrorenen Gewebelöcke bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

2.2.1.4 Asservierung von Gewebe zur RNA-Extraktion

Gewebe, aus denen zu einem späteren Zeitpunkt RNA extrahiert werden sollte, wurden in ein ausreichend großes Volumen an RNAlater (ca. 1ml auf 100g) gegeben und zur maximalen Emersion der Flüssigkeit ins Gewebe 48h bei 4°C gelagert. Anschließend erfolgte eine Lagerung der Gewebe bei -20°C, bei einer längerfristig angelegten Aufbewahrung anschließend eine Überführung auf -80°C.

2.2.2 Anfertigung der Gewebeschnitte

2.2.2.1 Silianisierung der Objektträger

Die Beschichtung mit TESAP (Triethoxyilyl-propylamin) diente der verbesserten Anhaftung sowohl der Kryo- als auch der Paraffin-Schnitte an den Objektträgern. Sie erfolgte nach gründlichem Waschen der Objektträger in Spülmittel und 70% Isopropanol durch kurzes (ca. 30s) Eintauchen der getrockneten Objektträger in Aceton + 2% TESAP, 2x Aceton und 2x aq.bidest. Nach dem Trocknen bei 42°C konnten die Gewebe aufgezogen oder die OT bis zur Verwendung staubfrei bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

2.2.2.2 Schneiden der Gewebe

Von den Paraffinblöcken wurden am Rotationsmikrotom 7µm dicke Serienschnitte angefertigt, im 42°C warmen Wasserbad gestreckt und auf silianisierte Objektträger aufgezogen. Auf einer 42°C warmen Heizplatte wurden die Schnitte zusätzlich gestreckt und getrocknet und anschließend im Umluftofen für mehrere Stunden bei 60°C an den Objektträgern angebacken.

Bis zur weiteren Verwendung wurden die Schnitte bei Raumtemperatur staubfrei gelagert. Die PFA- und unfixierten, in TissueTek O.T.C. eingefrorenen Gewebe wurden am Kryostat auf 14µm (für IHC, siehe 2.6.) bzw. 20µm (für ISH, siehe 2.7.) Dicke geschnitten und in Serie auf silanisierte, bei Raumtemperatur gehaltene Objektträger aufgezogen. Nach 20-30min Trocknung an der Luft erfolgte entweder die weitere Verarbeitung oder Lagerung bei -70°C.

2.2.3 Histologische Färbungen

2.2.3.1 Giemsa-Färbung

Die Übersichtsfärbung nach Giemsa (enthaltene Farbstoffe: Azur-Eosin und Methylenblau) diente der qualitativen Beurteilung der Gewebe, bei Gehirnschnitten außerdem der Lokalisation der motorischen Hirnnervenkerne und anderer Areale, sowie bei Rückenmarksschnitten der Feststellung der Schnittebene im Lumbalmark. Zu diesem Zweck wurden die Paraffinschnitte zunächst in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert: je 5min 3x Xylol, 2x 100%, 96%, 80%, 70% Isopropanol, aq.bidest. Anschließend wurden die Schnitte für 30-60min in der nach Filtrieren 1:100 in aq.bidest verdünnten Giemsa-Stammlösung eingefärbt. Die Differenzierung der Rottöne (Azur-Eosin) erfolgte in mit 2-3 Tropfen Essigsäure versetztem aq.bidest, die der Blautöne (Methylenblau) in 96%Isopropanol. Die Farbdifferenzierung wurde nach eigenem Ermessen vorgenommen und variierte je nach dem zu färbenden Gewebe, blieb jedoch grundsätzlich im Bereich einiger Sekunden. Anschließend erfolgte die Dehydrierung in 3x 5min 100% Isopropanol und 3x Xylol, danach wurden die Schnitte mit Depex bedeckt und mit Deckgläschen versehen.

2.2.3.2 Kresylviolett-Färbung

Dieser basische Farbstoff dient hauptsächlich der Darstellung von Zellkernen und wurde in diesem Fall zur Hintergrundfärbung der aus der ISH mit Radioaktivsonden (siehe 2.7.4.) resultierenden körnigen Signale und deren Zuordnung zu einzelnen Zellen verwendet. Nach ausreichendem Wässern der Schnitte erfolgte die Färbung für 15min in der Kresylviolett-Lösung und nach erneutem, kurzen Wässern in aq.bidest die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (je 2min 70%, 80%, 96%, 3x 100% Isopropanol) und 3x 5min Xylol. Anschließend wurden die Schnitte mit Depex bedeckt und mit Deckgläschen versehen.

2.3 Primäre Astrozytenkultur

Um Astrozyten-Kulturen einer möglichst hohen Reinheit und eine maximale Zellausbeute zu erzielen, wurden mindestens 8 neonatale C57BL/6-Mäuse (P0-3) präpariert, da Astrozyten in diesem Entwicklungsstadium die höchste Proliferationsrate aufweisen. Präparation und sämtliche Zellkultur-Arbeiten fanden in Sterilbänken statt. Die Mäuse wurden dekapitiert und die Kopfhaut mit 70% Ethanol desinfiziert. Nach der sorgfältigen Entfernung von Kopfhaut, Schädeldecke und Meningen wurden die kortikalen Schichten beider Hirnhemisphären mit einer feinen Pinzette abgehoben und in einer Petrischale mit 1x CMF auf Eis gesammelt. Zur Vereinzelung der Zellen wurden die Gewebstücke in ein 70µm-Zellsieb in einer Petrischale mit 1x CMF transferiert und vorsichtig mit einem Spritzen-Stempel durch das Sieb gerieben. Die erhaltene Zellsuspension wurde in einem 50 ml-Röhrchen gesammelt und das Sieb mehrfach mit 1x CMF nachgespült. Die Zellen dieser Lösung wurden durch Zentrifugation über 5min bei 4°C und 1000rpm zu einem Pellet sedimentiert und der Überstand entfernt. Um extrazelluläre Proteine und Gewebsstrukturen zu entfernen und so eine Aggregatbildung der Zellen zu verhindern, wurde das Zellpellet mit 3ml 0,25% Trypsin/1x CMF resuspendiert, für 20min bei 37°C im Wasserbad inkubiert und gelegentlich geschüttelt. Die enzymatische Aktivität des Trypsins wurde durch Zugabe des gleichen Volumens DMEM-10/Glk. inaktiviert. Extrazelluläre, genomische DNA aus zerstörten Zellen wurde durch Zugabe von 30µl 10% DNase1/DMEM und Inkubation über 10min bei 37°C im Wasserbad verdaut und die Zellen mithilfe einer Pasteurpipette durch intensives Trituieren vereinzelt. Anschließend wurden die Zellen erneut pelletiert (1000rpm, 10min, 4°C) und zweimal mit eiskaltem 1x PBS gewaschen. Zur Ermittlung der erhaltenen Zellzahl wurde das Zellpellet in 5ml Glukose-Medium (DMEM/4,5 g/L Glukose) resuspendiert, 10µl dieser Suspension mit 5µl Trypanblau gemischt, für 1min bei 37°C im Brutschrank inkubiert und anschließend in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt. Die Zellzahl wurde auf circa 2×10^5 Zellen/ml eingestellt und je 5ml in einer T25-Kulturflasche für Primärkulturen ausgesät. Zweimal pro Woche wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und das Glukose- oder Sorbitol-Medium gewechselt. Um den Anteil der Mikroglia an den Primärkulturen möglichst gering zu halten, wurden folgende Methoden miteinander kombiniert: i) Wechseln des Kulturmediums bei etwa 70% Konfluenz der Zellen auf Sorbitol-Medium, ii) tägliche Behandlung 100% konfluenten Zellen mit 8µM Cytosin-Arabinosid über 7-9 Tage, iii) Abschütteln oberflächlicher Mikroglia am Tag der Zellernte (vor der Lyse) durch Rotation der Medium-enthaltenden T25-Flaschen (60rpm, 30min, 4°C). Bei Erreichen einer Zell-Konfluenz von etwa 100% und ggf. nach anschließenden Behandlungen zur Mikroglia-Entfernung wurden die Zellen geerntet und die RNA extrahiert (siehe 2.5.1.3).

2.4 Laser-Mikrodissektion

Die *Laser Capture Microdissection* (LCM) ist ein Verfahren, mit dem gezielt einzelne Areale oder gar Einzelzellen aus einem Gewebeschnitt herausgelöst werden können. Die Technik basiert auf der Verwendung eines beweglichen, gebündelten Laserstrahls, mit dessen Energie feine, nur wenige μm breite Verbrennungsschnitte erzeugt und damit die festgelegte Zellen/Areale vom Restgewebe getrennt werden. Anschließend wird mittels eines schwach gebündelten, kurzen Laser-Impulses das ausgeschnittene Gewebeareal beziehungsweise die jeweilige Einzelzelle in die Kappe eines über dem Schnitt befindlichen Eppendorf-Gefäßes katapultiert. Die Kappen der Eppendorf-Gefäße sind zur optimalen Haftung der isolierten Zellen/Gewebsstücke mit einer speziellen Folie beschichtet. Um Gewebsareale besser von dem Objektträger lösen zu können, werden ebenfalls mit einer Spezial-Folie beschichtete Objektträger benutzt. Durchgeführt wurde die Mikrodissektion ausschließlich an $10\mu\text{m}$ dünnen Kryoschnitten, die zur Erhaltung der später zu isolierenden RNA dauerhaft (bei Transport, Schneiden im Kryotom, Aufbewahrung) bei möglichst niedrigen Temperaturen von maximal -20°C gehalten wurden. Zur Sichtbarmachung der Gewebsstrukturen wurden die Schnitte vor der Mikrodissektion Kresylviolett gefärbt. Um dabei den Abbau und Zerfall der zellulären RNA im Gewebe zu verhindern, wurden die Schnitte direkt nach Entnahme aus -70°C gefärbt und ein abgewandeltes, verkürztes Färbeprotokoll mit eiskalten Lösungen verwendet:

Verkürzte KV-Färbung für Mikrodissektion:

<u>Lösung</u>	<u>Zeit</u>
70%EtOH	2min
KV-Lösung	30sec
70%EtOH	5sec
100%EtOH	5sec

Nach anschließender Lufttrocknung bei Raumtemperatur konnten die Schnitte der Laser-Mikrodissektion unterzogen werden.

2.5 Molekulare und Mikrobiologische Verfahren

2.5.1 Allgemeine Molekularbiologische Methoden

2.5.1.1 Extraktion genomischer DNA

Eine Extraktion genomischer DNA wurde nur für die Genotypisierung der verschiedenen Mausstämmen (siehe 2.1.2) verwendet. Die den Mäusen abgenommenen Ohrstanzen wurden über Nacht bei 55°C in 50µl Lysispuffer verdaut, die dadurch gelöste DNA 1h bei 85°C denaturiert und die unverdaulichen Überreste 1min bei 13.000rpm abzentrifugiert. Bis zur Verwendung wurde die DNA bei -20°C aufbewahrt.

2.5.1.2 RNA-Extraktion aus Geweben

Die RNA-Extraktion aus Geweben erfolgte über die Trizol-Chloroformpräzipitation. Um den Abbau der RNA während der Prozedur zu vermeiden wurde ausschließlich auf Eis gearbeitet und alle verwendeten Materialien zuvor mit RNAse und DEPC-H₂O (0,01 % Diethylpyrocarbonat in ddH₂O) RNAse-frei gereinigt. Die in RNAlater aufbewahrten Gewebe wurden gründlich mit PBS abgespült und in Trizol (1ml pro 50g Gewebe) überführt, frische Gewebe direkt in Trizol-Reagenz gegeben. In einem Glas-Potter wurde das Gewebe homogenisiert, bei Bedarf in 1ml-Aliquots verteilt und je 200µl Chloroform hinzugefügt. Nach kräftigem Schütteln sowie kurzer Inkubation (3min) bei Raumtemperatur erfolgte die Zentrifugation mit 12.000g für 15min bei 4°C. Die wässrige, RNA-haltige Phase wurde abgenommen und in ein neues Röhrchen überführt, 500µl Isopropanol hinzugegeben und gut gemischt. Bei der anschließenden Inkubation für 15min bei Raumtemperatur erfolgt die Präzipitation der RNA, diese durch die Zentrifugation (12.000g, 15min, 4°C) sedimentiert und der Überstand verworfen. Das RNA-Pellet wurde zweimal mit 1ml 75% Ethanol gewaschen (d.h. gelöst, zentrifugiert und der Überstand verworfen). Zum vollständigen Entfernen des Ethanols wurde das RNA-Pellet bei Raumtemperatur getrocknet, anschließend in 50µl DEPC-H₂O resuspendiert und mittels Spektrometrie die Konzentration der gelösten RNA bestimmt (siehe 2.5.1.4).

2.5.1.3 RNA-Extraktion aus Zellen

Sowohl im Fall der Primärkulturen (siehe 2.3) als auch den durch Mikrodissektion (siehe 2.4) gewonnenen Zellen wurde die zelluläre RNA mittels eines RNeasy Kits (Qiagen) extrahiert.

Aufgrund der verschiedenen Quantitäten wurde für Primärkulturen der RNeasy Mini, für Zellen aus der Mikrodissektion das RNeasy Mikro Kit verwendet.

Primäre Astrozyten:

Vor der Lyse der Zellen wurden nicht-adhärenente Zellen (= mögliche Verunreinigungen mit Oligodendrozyten und Mikroglia) durch Schütteln der T25-Flaschen bei 60rpm über 30min entfernt. Um eine Hemmung der anschließenden Trypsinierung durch im Medium enthaltende Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen zu vermeiden, wurden die Kulturen in der T25-Flasche mit 5ml PBS gewaschen. Anschließend wurde pro Flasche 1ml Trypsin-Lösung auf die Zellen gegeben und nach kurzem Schwenken 4-5min bei 37°C inkubiert. War nach dieser Zeit ein deutliches Ablösen der Zellen zu erkennen, wurden die restlichen noch adhärenenten Zellen durch Klopfen der Flasche vom Untergrund gelöst. Die Aktivität des Trypsins wurde durch die Zugabe von 5ml serumhaltigen Medium gestoppt, die Suspension mit den gelösten Zellen in einem 15 oder 50ml-Röhrchen überführt und die erhaltene Zellzahl mittels der Neubauerzählkammer ermittelt. Die anschließende RNA-Extraktion erfolgte mittels des RNeasy Mini Kit (Qiagen), das eine maximale Beladung der Säulen mit 1×10^7 Zellen in einem Ausgangsvolumen von 600 μl erlaubt. Anhand der erhaltenen Zellzahl wurde die benötigte Menge an RLT-Puffer mit 10 μl β -Mercaptoethanol pro 600 μl RLT versetzt, die Zellen bei 1000rpm für 10min bei 4°C pelletiert nach Abnahme der Mediumlösung in RLT resuspendiert. Zum Entfernen von Proteinen und sonstigen Zellresten wurden 600 μl des entstehenden Zelllysats auf einen QIAshredder (Qiagen) gegeben und 2min bei 10.000g zentrifugiert. Der die Nukleinsäuren enthaltende Durchfluss wurde zum Entfernen von DNA zu gleichen Teilen auf zwei gDNA-Eliminator-Säulen gegeben, 15sec bei 10.000g zentrifugiert und der Durchfluss zur Präzipitation der RNA mit gleichem Volumen an 70%EtOH versetzt und gut gemischt. Anschließend wurde je eine RNeasy Mini Säule mit 700 μl des Gemisches beladen und die präipitierte RNA durch 15sec Zentrifugation bei 10.000g an die Membran gebunden. Um die RNA von Ethanolresten und anderer noch vorhandener Verunreinigungen (z.B. Salze) zu befreien, erfolgten 3 Waschschrte: i) Zugabe von 350 μl RWI-Puffer, 15sec Zentrifugation bei 10.000g, ii) Zugabe von 500 μl RPE-Puffer, 15sec Zentrifugation bei 10.000g, iii) Zugabe von 500 μl RPE-Puffer, 2min Zentrifugation bei 10.000g. Im Anschluss an diese Waschungen wurde der Durchfluss verworfen und die Säule 1min bei 10.000g trocken zentrifugiert. Nach Überführen in ein sauberes 1,5ml-Reaktionsgefäß wurden zur Elution der RNA 50 μl RNase-freies Wasser auf die Säule gegeben und 1min bei 10.000g zentrifugiert. Nach abschließender Konzentrationsbestimmung (siehe 2.5.1.4) wurde die RNA bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Zellen aus Mikrodissektion:

Die anfängliche Lyse der Mikrodissektionsproben wurde von dem Qiagen-Protokoll leicht abweichend durchgeführt. In die speziellen Mikrodissektions-Eppendorf-Gefäße wurden 350µl RLT Lysepuffer (+β-Mercapto-Ethanol) gegeben und die Gefäße kurz mit dem Kopfteil gevortext, da sich die Gewebestücke im Eppendorf-Deckel befinden. Anschließend wurden die Gefäße auf dem Kopf stehend für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der weitere Extraktionsprozess wurde wie im Handbuch des Kits beschrieben durchgeführt (analog des Verfahrens für die RNA-Extraktion aus Zellkulturen, siehe 2.5.1.3).

2.5.1.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung beruht auf der Tatsache, dass Nukleinsäuren aufgrund ihrer aromatischen Ringe UV-Licht absorbieren, wobei das Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm liegt. Die Berechnung der Konzentration erfolgte nach Messung der Absorption (= optische Dichte, OD) über eine Abwandlung des Lambert-Beer'schen Gesetz. Diese ist nötig da durch die unterschiedliche Sequenzfolge der DNA-Stränge eine genaue Definition des Extinktionskoeffizienten unmöglich ist. Man arbeitet deshalb mit Näherungswerten, aus denen sich für doppelsträngige DNA bei einer OD von 1 der Näherungswert einer Konzentration von 50µg/ml und für RNA 33µg/ml ergibt. Nach Messung der Absorption einer Nukleinsäurelösung berechnet sich die vorliegende Konzentration wie folgt:

$$c[\text{dsDNA}] = \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Näherungsfaktor } 50\mu\text{g/ml}$$

$$c[\text{ssRNA}] = \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Näherungsfaktor } 33\mu\text{g/ml}$$

Um Fehlberechnungen durch Proteinverunreinigungen auszuschließen, wird zusätzlich bei einer Wellenlänge von 280nm, dem Absorptionsmaximum aromatischer Aminosäurereste, gemessen. Der Quotient der $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ gilt als Maß der Reinheit der DNA-Präparation und sollte für DNA bei ca. 1,8 und für RNA bei 2 liegen.

2.5.1.5 DNase-Verdau

Um reine RNA für die Reverse Transkription (siehe 2.5.1.6) zu erhalten wurde ein DNA-Verdau mit DNaseI (10 U/µl), d.h. ein enzymatischer Abbau der eventuell noch in der Lösung vorhandenen genomischen DNA, durchgeführt. Dabei wurden 1,1µg RNA eingesetzt, um anschließend ca. 1µg Gesamt-RNA für die Reverse Transkription zu erhalten.

Ansatz DNase Verdau:	<u>Reagenz</u>	<u>Menge</u>
	Gesamt-RNA	1,1 µg
	10x Reaktionspuffer mit MgCl ₂	1 µl
	DNase I (1u/µl, RNase-frei)	1 µl
	DEPC- H ₂ O	ad 9 µl

Der Verdau erfolgte bei 37°C für 30min, anschließend wurde die DNase mit 1 µl 25mM EDTA und durch Inkubation bei 60°C (10min) inaktiviert. Zur Erfolgskontrolle des Verdaus wurde der Ansatz durch eine Polymerasekettenreaktion (siehe 2.5.1.7) mit Primern für die ubiquitär exprimierte Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) auf seinen Gehalt an genomischer DNA überprüft. Kam es ohne DNA-Matrize für die Polymerase zu keiner selektiven Amplifikation (fehlende Bande im Agarosegel, siehe 2.5.1.8) war der Verdau erfolgreich und die Probe konnte für die Reverse Transkription eingesetzt werden. Zeigte sich noch eine GAPDH-Bande, wurde der DNase-Verdau wiederholt.

2.5.1.6 Reverse Transkription

Die extrahierte Gesamt-RNA muss zur Gewinnung von DNA-Matrizen für nachfolgende Experimente in cDNA (*complementary* oder *copy* DNA), also in die der mRNA-Sequenz komplementäre DNA, umgeschrieben werden. Bei der Reversen Transkription (RT) schreibt die RNA-abhängige DNA-Polymerase eines Retrovirus die vorhandene RNA in einen DNA-Strang um. Dazu können sowohl sogenannte „*random hexamer*“-Primer verwendet werden, die sich an die gesamte RNA anlagern und damit auch Transfer-RNA (tRNA) und ribosomale RNA (rRNA) erfassen, als auch die 16-18 Basenpaare langen Oligo(dT)-Primer, die spezifisch an die Poly-A Schwänze der *messenger*-RNA(mRNA)-Sequenz binden. Da die Oligo(dT)-Primer nur am äußersten 3'-Ende einer mRNA ansetzen, empfiehlt sich grundsätzlich, vor allem aber bei langen Zielgenen, der kombinierte Einsatz von „*random hexamer*“- und Oligo(dT)-Primern, um ein vollständiges Umschreiben der Zielstränge zu gewährleisten. Zur cDNA-Synthese wurde das RevertAid-RT-Kit verwendet und im Thermocycler umgeschrieben, wobei sich die Temperaturenfolge wie folgt erklärt: Der 25°C-Schritt dient zur optimalen Anlagerung der Random Hexamer-Primer. Bei 42°C arbeitet die Reverse Transkriptase mit maximaler Geschwindigkeit und verlängert die angelagerten Primer komplementär zur gebundenen RNA mit den vorhandenen dNTPs. Da in dieser Reaktion keine Amplifikation, sondern nur ein Umschreiben der Information erreicht werden soll, findet sich im RT-Programm keine zyklische Temperatur-Abfolge. Mit dem 72°C-Schritt wird die Reverse Transkriptase schließlich denaturiert und zerstört. Nach Ablauf der RT wird das Reaktionsvo-

lumen durch Zugabe von 30 µl H₂O auf 50 µl gebracht. Von diesem Ansatz kann anschließend ein Volumen von 1-4 µl in eine PCR (siehe 2.5.1.7) eingesetzt werden.

Ansatz RT:	<u>Reagenz</u>	<u>Menge</u>	<u>Temperaturenfolge:</u>	
	Gesamt-RNA	1 µg	25°C	5min
	Oligo(dT)-Primer	1 µl	42°C	60min
	5x Reaktionspuffer	2 µl	70°C	10min
	RNAse Inhibitor	1 µl	8°C	∞
	dNTP Mix 10mM	2 µl		
	Transkriptase	1 µl		
	Reinstwasser RNAse frei	ad 10µl		

2.5.1.7 Polymerasekettenreaktion

Als PCR (= *polymerase chain reaction*) bezeichnet man eine Methode zur selektiven Amplifikation bestimmter Nukleinsäureabschnitte wie z.B. aus Geweben oder Zellkulturen gewonnener genomischer DNA oder cDNA (siehe unten). Dabei macht man sich die Eigenschaft von DNA-Polymerasen zunutze, DNA in Gegenwart eines *Primer* (= kurzer Abschnitt doppelsträngiger DNA mit freiem 3'OH-Ende) zu duplizieren. In der PCR werden daher sequenzspezifische *Primer* („vorwärts“ und „rückwärts“) von etwa 20-30 Basenpaaren Länge eingesetzt, um den sich dazwischen befindlichen Sequenzbereich der DNA durch die DNA-Polymerase selektiv zu amplifizieren.

Neben DNA und *Primern* muss der PCR-Ansatz eine Pufferlösung, Nukleotide (dNTP's) als Ausgangsmaterial der Synthese und MgCl₂ als Cofaktor der DNA-Polymerase enthalten. Die PCR selbst läuft in mehreren Schritten ab: Durch Denaturierung bei 92°C wird der DNA-Strang in die Einzelstränge zerlegt; bei der anschließenden Anlagerung binden „vorwärts“- und „rückwärts“-*Primer* spezifisch an ihre Zielsequenz in beiden Einzelsträngen. Die Anlagerungstemperatur ist dabei von der Schmelztemperatur der eingesetzten *Primer* abhängig. Im darauffolgenden Elongationsschritt verlängert die DNA-Polymerase die Sequenz in 5'-3'-Richtung, die Elongationstemperatur liegt dabei am Wirkungsoptimum der eingesetzten, thermostabilen DNA-Polymerase, hier aus *Thermus aquaticus* (Taq): 72°C. Pro PCR-Zyklus kommt es zur Verdopplung des zwischen den *Primern* befindlichen Bereichs, durch zyklische Wiederholung der 3 Grundschritte (Denaturierung, Anlagerung, Elongation) werden die Zielsequenzen amplifiziert, wobei die Zielsequenz durch die exponentielle Vermehrung bei ausreichender Zyklusanzahl millionenfach kopiert wird.

Durchgeführt wurden PCR hier vor allem zur Genotypisierung der Mausstämme (siehe 2.1.2) und der Generation von DNA-Matrizen für spezifische Ribosonden (siehe 2.7.2), die Auflistung der dafür verwendete Primer sowie entsprechende Zyklenfolgen finden sich dort. Außerdem wurden Zelltypen und Gewebe auf die Expression verschiedener Gene überprüft. Zur Amplifikation der Zielgene wurden die Primer der Ribosonden (siehe 2.7.1) verwendet, als Kontrollen dienten zudem:

Tabelle 2.5.1 PCR-Primer. Auflistung zeigt ausschließlich die als Kontrolle verwendeten Primer. Eine Auflistung der sonstigen Primer finden sich bei den Beschreibungen ihrer jeweiligen Verwendung.

Primer-ID	Zielgen (Verwendung)	Orientierung	Sequenz (3' – 5')
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Haushaltsgen)	<i>forward</i>	GGT CAT CCC AGA GCT GAA CG
		<i>reverse</i>	TTG CTG TTG AAG TCG CAG GA
VACHT	vesiculärer Acetylcholintransporter (Motoneuronen-Marker)	<i>forward</i>	CGC CCT GAA TTC CTT TGC T
		<i>reverse</i>	CCT CCC TGA TCC ATT CCC TC
Csf1-R	Colony-stimulating factor 1-Rezeptor (Mikroglia-Marker)	<i>forward</i>	GCC GTC TCC CTA GGA CAA AGC AAG C
		<i>reverse</i>	TCT CGA TGA TCT TCC CAG GCA CCT G
GFAP	Glial fibrillary acidic Protein (Astroglia-Marker)	<i>forward</i>	GGA GGG CA AGA AAA ACC GCA TCA C
		<i>reverse</i>	ACC ACG TCC TTG TGC TCC TGC TTC G

Die PCRs wurden entweder mit der RedTaq oder der KAPAFast-Polymerase durchgeführt, die sich stark in ihrer Arbeitgeschwindigkeit unterscheiden, so dass die Elongationszeit deutlich variiert. Außerdem ist die KAPAFast bereits mit Puffer und dNTPs versetzt, während bei Verwendung der RedTaq alle Reagenzien einzeln hinzugefügt werden müssen. Aus diesen Unterschieden resultieren folgende Protokolle:

RedTaq-PCR:	<u>Reagenz</u>	<u>Menge</u>	Zyklusfolge:	<u>Temperatur</u>	<u>Zeit</u>	<u>Wdh.</u>
	DNA-Matritze	1µl		94°C	5min	1x
	10x Puffer	2µl		94°C	30sec	} 35x
	dNTPs	0,5µl		T(A)	30sec	
	Primer	je 0,2µl		72°C	1min	
	RedTaq	1µl		72°C	5min	} 1x
	Reinstwasser	ad 20µl		8°C	∞	

KAPAFast-PCR:	<u>Reagenz</u>	<u>Menge</u>	Zyklusfolge:	<u>Temperatur</u>	<u>Zeit</u>	<u>Wdh.</u>
	DNA-Matritze	1-4µl		94°C	5min	1x
	2x KAPA Mix	10µl		94°C	5sec	} 35x
	Primer	je 0,2µl		T(A)	5sec	
	Reinstwasser	ad 20µl		72°C	15sec	
	RedTaq	1µl		72°C	5min	} 1x
				8°C	∞	

2.5.1.8 Agarose-Gelelektrophorese

Als Elektrophorese bezeichnet man die Auftrennung von geladenen Molekülen im elektrischen Feld. Nukleinsäuren lassen sich elektrophoretisch auftrennen, da ihre negativ geladenen Phosphatgruppen zur positiv geladenen Anode wandern. DNA-Moleküle kollidieren abhängig von ihrer Größe mit der Gelmatrix aus Agarose und werden gebremst, so dass sich DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge oder Eigenschaft (z.B. zyklisch vs. linear) voneinander trennen lassen. Die Erfolge von Restriktionen oder PCRs können so überprüft, aber auch DNA-Fragmente bestimmter Größe von denen anderer Größen getrennt und anschließend einzeln isoliert werden. In allen Fällen wurden Agarosegele derselben Dichte (1,5% w/v Aga-

rose in TAE) verwendet, die zur Visualisierung der DNA-Fragmente mit 0,5µg/ml Ethidiumbromid versetzt wurden. Ethidiumbromid interkaliert in Nukleinsäuren und emittiert nach Anregung mit UV-Licht im orange-roten Bereich (590nm), wobei die Bindung an DNA eine Verstärkung der Fluoreszenz bewirkt und damit die Banden von DNA-Fragmenten gleicher Größe im Gel sichtbar werden. Die zu analysierenden Proben wurden mit Probenpuffer versetzt, deren zugesetzte Farbstoffe mit genau definiertem Laufverhalten entsprechend einer DNA-Fragmentgröße ein Abschätzen der Auftrennung während der Elektrophorese zuließen. Die Auftrennung in TAE-Laufpuffer erfolgte bei einer angelegten Spannung von ca. 10V/cm² Gelgröße. Zusätzlich eingesetzte Marker mit Fragmenten definierter Größenabstände erlaubten dabei das Abschätzen der Größe von DNA-Fragmenten der Proben.

2.5.1.9 Gelextraktion

Die Trennung des durch PCR entstandenen Fragments von der cDNA und den überschüssigen Primern erfolgte durch Gelelektrophorese. Dazu wurde der gesamte PCR-Ansatz auf das Gel aufgetragen und nach ausreichender Trennung der Banden diejenige mit der richtigen Größe unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten. Die Extraktion der Nukleinsäuren aus dem Agarosegel erfolgte über das NucleoSpin-Gelextraktions-Kit, das nach Herstellerangaben verwendet wurde. Anschließend lag das aufgereinigte DNA-Fragment in TE-Puffer gelöst vor und wurde zunächst einer Konzentrationsbestimmung (siehe 2.5.1.4) unterzogen und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

2.5.2 Klonierung von DNA-Fragmenten in bakterielle Plasmidvektoren

Die Transformation wurde entweder mittels des *TOPO TA Cloning Kit* und der dazugehörigen Materialien (Plasmidvektor pCR®2.1TOPO, elektrokompenten TOP10 Zellen, Puffern und Lösungen) oder unter der Verwendung des pGEM®T-Vektors mit Klonierung in chemisch kompetente *E.coli*-Bakterien durchgeführt. Das Verfahren dient dazu, DNA-Fragmente in Plasmide einzufügen und dabei an andere Sequenzen bestimmter Funktionen zu koppeln (z.B. spezielle Promotoren oder Fusionsproteinsequenzen) und anschließend zu Vermehrung in schnell replizierende Bakterienstämme einzubringen. Im vorliegenden Fall werden die Transformationen ausnahmslos zur Herstellung einer so genannten Ribosonde für die *in situ*-Hybridisierung durchgeführt, wobei neben der Vermehrung der Sonden-Matrize v.a. die für die anschließende *in vitro*-Transkription notwendige Kopplung an virale Promotoren von Bedeutung ist.

2.5.2.1 Ligation in pCR®2.1TOPO-Vektor

Als Ligation bezeichnet man das Einfügen eines DNA-Fragments (*Insert*) in einen Plasmidvektor. Dabei handelt es sich um ein ringförmiges DNA-Fragment von einigen 100 bis mehreren 1000 Basenpaaren mit speziellen Eigenschaften, die auf die entsprechende Verwendung angepasst sind. Der Aufbau des hier verwendeten Vektors ist unten gezeigt, die Insertion eines PCR-Produktes funktioniert wie folgt: Es muss darauf geachtet werden, dass die zur PCR verwendete *Taq*-Polymerase eine *template*-unabhängige, terminale Transferase-Aktivität besitzt, d.h. dass an das 3'-Ende des PCR-Produkts ein einzelnes Adenosin addiert wird. Das Plasmid pCR®2.1-TOPO® liegt als sogenannter "aktivierter Vektor" vor, d.h. in linearisierter Form mit einem einfachen 3'-Thymidin-Überhang und kovalent daran gebundener Topoisomerase 1. Das aus dem *Vaccinia*-Virus stammende Enzym greift doppelsträngige DNA nach einem 5'-CCCTT in einem Strang an und spaltet die Phosphodiester-Bindung, wobei die durch die Spaltung freigeordnete Energie in der kovalenten Bindung zwischen der Topoisomerase und dem 3'-Ende der gespaltenen DNA gespeichert bleibt. Die 3'-Adenosin-Überhänge des PCR-Produkts (=Insert) ligieren hocheffizient mit den 3'-Thymidin-Überhängen des aktivierten Vektors, wobei die kovalente Bindung zwischen der Vektor-DNA und der Topoisomerase durch das 5'-Hydroxyl-Ende des *Inserts* angegriffen wird. Unter Freisetzung der Topoisomerase bildet sich eine Phosphodiester-Bindung zwischen dem 3'-Thymidin-Überhang des Plasmids und dem 5'-Ende des *Inserts*, der Vektor ist damit unter erfolgreicher Integration des *PCR-Produktes* geschlossen. Die Zusammensetzung des Ligationansatzes erfolgte der Anleitung des Kits entsprechend des unten stehenden Protokolls und wurde 5min bei RT inkubiert.

Ligationsansatz TOPO:	<u>Reagenz</u>	<u>Volumen/Menge/Konzentration</u>
	PCR-Produkt	0,05µg
	Salzlösung	0,25µl (300mM NaCl2, 15mM Mgcl2)
	Vektor	1µl (10ng/ml Plasmid in 50%Glycerol)
	Reinstwasser	3µl

2.5.2.2 Ligation in pGEM®T-Vektor

Auch die Ligation eines *Inserts* in den pGEM®T-Vektor basiert auf der Basenpaarung der durch die Polymerase erzeugten Adenosin-Überhänge des PCR-Produkts an die Tyrosin-Überhänge des Plasmids. Allerdings ist dieser Vektor nicht „aktiviert“, so dass dem Ligationansatz eine Ligase hinzugefügt werden muss. Dieses Enzym erkennt die zwischen Vektor und Insert befindliche Lücke im DNA-Strang und schließt diesen unter Bildung einer

Phosphodiester-Bindung zwischen dem 3'-Thymidin-Überhang des Plamids und dem 5'-Ende des *Inserts*. Der Vektor ist damit unter erfolgreicher Integration des *PCR-Produktes* geschlossen. Zur optimalen Integration wurde in diesem Fall die eingesetzte Menge des PCR-Produktes abhängig von dessen Fragmentlänge nach folgender Berechnung angepasst:

$$\text{Menge PCR-Produkt [ng]} = \text{Vektormenge (=50ng)} * \text{Länge PCR-Produkt [kb]} / \text{Vektorlänge (=3kb)}$$

Die Ligation erfolgte durch Inkubation des Ligationsansatzes für 1h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4-8°C.

Ligationsansatz pGEMT:	Reagenz	Volumen/Menge/Konzentration
	PCR-Produkt	0,05µg
	2x Rapid Ligations-Puffer	5µl
	Vektor	1µl (50ng/µl Plasmid)
	T4 Ligase	1µl
	Reinstwasser	ad 10µl

2.5.2.3 Transformation elektrokompenter Zellen

Bei der Elektroporation wird die Zellmembran der Bakterien durch einen elektrischen Puls kurzfristig permeabilisiert, wodurch die Plasmid-DNA in die Zielzelle diffundieren kann. Sie liegt anschließend direkt im Zytoplasma vor, so dass sie für die bakterielle Translationsmaschinerie erreichbar ist und somit abgelesen und vervielfältigt wird. Den Herstellerangaben entsprechend wurden 40µl der frisch aufgetauten elektrokompenten TOP10 *E.Coli*-Zellen mit 2µl des TOPO-Ligationsansatzes (siehe 2.5.2.1) versetzt und vorsichtig vermischt. Nach Applikation eines kurzen Elektroschocks (1,8kV, 2-4msec) im Elektroporator wurden 250µl SOC-Medium hinzugegeben und die Zellen 1h bei 37°C und 250rpm inkubiert. Zu Selektion Plasmid- und *Insert*-positiver Klone (siehe 2.5.2.5) wurden abschließend 5µl der Bakterien-suspension auf Agar-Selektions-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.5.2.4 Transformation chemisch kompetenter Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen dient die Rubidiumchlorid-Methode, bei der die Zellmembran der Bakterien durch Anlagerung der Chlorid-Ionen instabilisiert und ihre negative Ladung reduziert wird. Dadurch kann sich das ebenfalls negativ geladenen Plasmid der Zelle besser annähern, die Membran analog des Elektroschocks (siehe 2.5.2.3) schon bei relativ niedrigen Temperaturen von 37-42°C durch einen Hitzeschock permeabilisiert werden und das Plasmid in die Zelle penetrieren. Zu diesem Zweck wurde eine Kultur der NEB10ß Zellen (*E.coli*) in 2,5ml LB-Medium angesetzt und über Nacht bei 37°C und 250rpm inku-

biert. Am folgenden Tag wurden 250ml LB-Medium (+20mM Magnesiumsulfat) mit der Übernachtskultur angeimpft und so lange bei 37°C und 180rpm in einem Schikanekolben inkubiert, bis das Medium durch die Zellvermehrung bei photometrischer Messung bei 600nm eine optische Dichte von 0,4 bis 0,7 aufwies. Nach Erreichen der optimalen Zelldichte wurde das Medium in einen Zentrifugationsbecher überführt und die Zellen durch Zentrifugation bei 4000rpm und 4°C über 5min pelletiert. Das erhaltene Pellet wurde in 100ml eiskaltem TFB1-Puffer (enthält das Rubidiumchlorid) resuspendiert, 5-10 min auf Eis inkubiert und anschließend erneut durch die Zentrifugation mit gleichen Parametern pelletiert. Anschließend wurden die Zellen mit 10ml eiskaltem TFB2-Puffer resuspendiert und 15-60min auf Eis inkubiert. Die erhaltene TFB2-Suspension der nun chemisch kompetenten Zellen wurde in 200µl Aliquots aufgeteilt und – sofern nicht sofort verwendet – in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Diese Kulturproben wurden bei -80°C bis zu 3 Monate gelagert und wurden vor Gebrauch schonend auf Eis aufgetaut.

Zur Transformation der chemisch kompetenten Bakterien wurden 3µl des pGEMT-Ligations-Ansatzes (siehe 2.5.2.2) in 200µl Zellsuspension gegeben und diese 15min auf Eis inkubiert. Um die Diffusion der Plasmide durch die permeable Membran zu forcieren, wurden die Bakterien 2min bei 42°C im Wasserbad inkubiert, anschließend zurück auf Eis geführt und erneut 2min inkubiert, um die Zellmembran wieder zu verschließen. Die nun transformierten Bakterien wurden in 1000µl SOC-Medium überführt und im Kulturröhrchen 1h bei 37°C und 180rpm inkubiert. In dieser Zeit findet die Transkription der in dem Plasmid vorhandenen, für die anschließende Selektion der Klone (siehe 2.5.2.5) benötigten Enzyme statt. Abschließend wurden 100-200 µl der Zellsuspension auf einer Agar-Selektions-Platte ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

2.5.2.5 Selektion transformierter Klone

Da weder gewährleistet ist, dass alle Plasmide des Ligationsansatzes das Insert eingeschlossen haben, noch dass alle Bakterien transformiert werden konnten (d.h. ein Plasmid aufgenommen haben), müssen die Plasmid-positiven Klone mit Insert-positiven Plasmiden selektiert werden. Basis dieser Selektion sind in der Plasmidsequenz enthaltene Antibiotika-Resistenzen und die enzymatische Umsetzung eines Farbstoffs. Dies funktioniert unter der Verwendung von Agar-Selektions-Platten, die einerseits mit 50µg/ml Ampicillin versetzt sind, so dass alle nicht transformierten Bakterien (ohne Plasmid und damit ohne Antibiotika-Resistenz) im Wachstum arretiert werden und keine Kolonien bilden. Des weiteren sind dem Agar 1mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) und 40µg/ml X-Gal zugesetzt. Bei Klonen ohne *Insert* ist das sogenannte *lac*-Operon intakt, wird durch IPTG induziert und die durch Transkription entstehende β-Galaktosidase setzt X-Gal zu einem blauen Farbstoff um.

Bei *Insert*-positiven Plasmiden ist das *lac*-Operon durch die Insertion unterbrochen und wird nicht mehr abgelesen. Entsprechend entsteht kein Farbstoff, so dass sich auf der Selektions-Platte Klon-Kolonien mit Insert-positivem Plasmid (weiß) leicht von jenen mit *Insert*-negativem Plasmid (blau) unterscheiden lassen. Zum „Ernten“ der erfolgreich transformierten Klone wurde eine Auswahl der *Insert*-positiven Kolonien mit einer sterilen Öse gepickt, in 5ml LB-Medium + 50µg/ml Ampicillin überimpft und über Nacht bei 37°C und 250rpm inkubiert.

2.5.3 Plasmidisolation

Abhängig von der weiteren Verwendung der isolierten Plasmid-DNA wird dieser Vorgang in unterschiedlichen Volumina durchgeführt: zur qualitativen Analyse des Plasmids wird eine sogenannte „Mini-Präp“ durchgeführt, zur quantitativen Ausbeute eine sogenannte „Maxi-Präp“. Dabei differieren die eingesetzten Volumina erheblich, der Übersichtlichkeit halber werden diese Angaben im Folgenden ausgelassen und sind unten vergleichend aufgeführt.

Zur Gewinnung hochreiner Plasmid-DNA wurden über Nacht Kulturen der gewünschten Bakterienklone hergestellt (Inkubation bei 37°C und 250 bzw. 180rpm in LB-Medium + Ampicillin) und die Zellen 5min bei 11.000g abzentrifugiert. Bei der Resuspendierung mit einem GTE-Puffer erfolgte die Lyse der Bakterienzellwand, anschließend das Aufbrechen der Zellmembran und Denaturierung aller Nukleinsäuren (chromosomale DNA, Plasmid-DNA, RNA) durch SDS (*Sodium-Dodecyl-Sulfat*) und Natronlauge (NaOH). Bei anschließender Zugabe von saurem Kalium-Acetat-Puffer (KAc) kam es zum Einen zur Komplexbildung des entstehenden Kaliumdodecylsulfats mit chromosomaler DNA, Proteinen und Zelltrümmern, zum Anderen führte die Neutralisierung des pH-Wertes zur Renaturierung der kleineren Plasmid-DNA und RNA. Diese verblieben im Überstand während sich die restlichen, komplexierten Zellbestandteile durch 5min Zentrifugation bei 11.000g entfernen ließen. Anschließend erfolgte eine Präzipitation der verbliebenen Nukleinsäuren mit 100% Isopropanol, 10min Zentrifugation bei 11.000g und anschließende Resuspendierung der Nukleinsäuren in TES-Puffer. Durch Zugabe von RNase A und anschließender, 15-minütiger Inkubation bei 37°C wurde die ebenfalls präzipitierte RNA verdaut. Durch die Zugabe von CPI-Reagenz wurden die RNase und andere, eventuell noch vorhandene Proteine durch kräftiges Mischen gefällt, so dass nach Zentrifugation (3min bei 11.000g) in der oberen, wässrigen Phase ausschließlich Plasmid-DNA vorlag. Die wässrige Phase wurde abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Plasmid-DNA mit 100% Isopropanol gefällt. Nach gründlicher Zentrifugation für 30min bei 11.000g wurde der Überstand verworfen, das Pellet an der Luft (mind. 30min bei RT) getrocknet und in TE-Puffer gelöst.

Plasmidisolation:	Reagenz	Volumen Mini-Präp	Volumen Maxi-Präp
	Übernachtskultur	2ml	250ml
	GTE-Puffer	150µl	3ml
	NaOH/SDS	300µl	6ml
	KAc-Lösung	225µl	4,5ml
	Isopropanol	600µl	9ml
	TES-Puffer	200µl	400µl
	RNase	2µl (20µg/ml)	5µl (10µg/ml)
	CPI-Reagenz	200µl	500µl
	Überstand	150µl	350µl
	Isopropanol	150µl	400µl
	TE-Puffer	20µl	200µl

Abschließend wurde die Konzentration der gewonnenen Plasmid-DNA bestimmt (siehe 2.5.1.4), übrige Bakterienkulturen wurden 1:1 mit 100% Glycerin versetzt und zur dauerhaften Lagerung zum eventuellen Animpfen weiterer Übernachtskulturen bei -20°C aufbewahrt.

2.5.4 Analyse und Weiterverarbeitung des isolierten Plasmids

Um die fertige DNA-Matrize für die Herstellung einer Ribosonde (siehe 2.7.2) zu erhalten, muss i) eine eventuelle Verunreinigung des zuvor gepickten Klons mit benachbarten Kolonien mit *Inserts* anderer Orientierung ausgeschlossen, ii) die Orientierung des *Inserts* innerhalb des Vektors zu ermittelt und iii) das Plasmid linearisiert werden.

2.5.4.1 Plasmid-Analyse durch *Insert-PCR*

Durch eine spezifische Kombination von Primern lässt sich durch eine PCR sowohl das Vorhandensein eines Inserts als auch dessen Orientierung innerhalb des Vektors ermitteln. Benutzt werden dafür einerseits die an den T7- bzw. Sp6-Promotor des Vektors angreifenden Primer (T7- bzw. Sp6-Primer), andererseits die schon für die Herstellung des PCR-Produkts (siehe 2.7.2) (*forward* bzw. *reverse*) benutzten und somit an den Enden des Inserts angreifenden Primer. Die PCR läuft nach Standardverfahren ab (siehe 2.5.7), wobei unter Verwendung dreier bestimmter Primerkombinationen die Entstehung von Banden in der anschließenden Gelelektrophorese (siehe 2.5.1.8) folgende Rückschlüsse erlaubt:

Bandenmuster *Insert-PCR*:

- 1.) T7 + Sp6 oder forward+reverse = Insert vorhanden
- 2.) T7 + forward oder Sp6+reverse = T7-antisense = Sp6-sense
- 3.) T7 + reverse oder Sp6+forward = Sp6-antisense = T7-sense

Entsteht sowohl in Primer-Kombination 2 als auch in Kombination 3 eine Bande, liegt eine Verunreinigung des Plasmids beziehungsweise des Bakterienklons mit einem anderen Plasmid/Klon mit entgegengesetzter *Insert*-Orientierung vor und ist damit nicht zu gebrauchen.

2.5.4.2 Plasmid-Linearisierung durch Restriktionsendonucleasen

Zur Analyse und Weiterverarbeitung des Vektors wurde sich hier der in der Plasmidsequenz vorhandenen Schnittstellen für Restriktionsendonucleasen bedient. Diese Enzyme spalten den Doppelstrang an jeweils spezifischen Sequenzmotiven (Palindrome), so dass das Plasmid bei Vorhandensein nur einer Schnittstelle linearisiert, bei mehreren Schnittstellen in mehrere lineare Fragmente zerlegt wird. Um festzustellen, ob die isolierten Plasmide das *Insert* enthalten, wurde eine Fragmentierung mit *EcoRI* vorgenommen, da in beiden Vektoren beiderseits der Integrationsstelle eine Schnittstelle vorliegt, so dass nach der Fragmentierung *Insert*-positive Plasmide in der Gelelektrophorese neben der Bande des linearisierten Plasmids (pCR-TOPO: 4kb, pGEMT: 3kb) eine der Insertgröße entsprechende Bande zeigen. Anders als bei der *Insert*-PCR (siehe 2.5.4.1) lässt dieses Verfahren jedoch keine Rückschlüsse auf die Orientierung des *Inserts* innerhalb des Vektors zu.

Da im Fall eines noch geschlossenen Plasmids die T7- oder Sp6-Polymerase im Anschluss an das *Insert* auch Vektorsequenzen umschreiben, irgendwann abbrechen und somit uneinheitliche Produkte mit unerwünschten Sequenzbereichen produzieren würde, ist es für die spätere *in vitro* Transkription (siehe 2.7.3) wichtig, das Plasmid zu linearisieren, um die Transkription nach dem *Insert* abzustoppen und ein Produkt einheitlicher Länge zu erhalten. Für eine Transkription mit T7 wird das Plasmid auf der gegenüberliegenden Seite des *Inserts*, also unmittelbar vor dem Sp6-Promotor gespalten, für eine Transkription mit Sp6 an einer Stelle zwischen *Insert* und T7-Promotor. Aufgrund des variierenden Aufbaus der beiden Vektoren wurden dazu folgende Restriktionsendonucleasen mit nur einer Schnittstelle innerhalb der Vektorsequenz verwendet: pCR-TOPO für T7: *BamHI*, pCR-TOPO für Sp6: *XbaI*, pGEMT für T7: *SacI* und pGEMT für Sp6: *SacII*.

Ansätze und Inkubationsprotokolle der verschiedenen Restriktionsreaktionen lauteten wie folgt, der 10µl Ansatz diente dabei der qualitativen Analyse (*Insert*-Test mit *EcoRI*), der 100µl-Ansatz der quantitativen Ausbeute (Linearisierungen).

Restriktionsverdau	Reagenz	10µl Ansatz	100µl Ansatz
	Plasmid-DNA	5µg	20µg
	Enzym	1µl (20U)	5µl (100U)
	10x Puffer	1µl	10µl
	Reinstwasser	ad 10µl	ad 100µl
	Enzym	Zeit	Temperatur
	<i>EcoRI</i> :	1h	37°C
	<i>BamHI</i> :	2h	37°C
	<i>XbaI</i> :	2h	37°C
	<i>Sac I</i>	2h	37°C
	<i>Sac II</i>	2h	37°C
			Puffer
			<i>EcoRI</i>
			<i>BamHI</i>
			NEB1
			NEB4
			NEB2

2.6 Immunhistochemie

Um Zielproteine und deren Lokalisation in verschiedenen Geweben spezifisch nachzuweisen, wurde sich verschiedener Verfahren der Immunhistochemie bedient. Zum hochsensitiven Nachweis diente eine Immun-Peroxidase-Färbung mit dem Diaminobenzidin/Nickelsulfat (DAB/Ni)-Detektionssystem. Dabei oxidiert eine an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase das farblose, lösliche DAB zu einem braunen, unlöslichen Farbstoff, der sich auf dem Gewebeschnitt absetzt und im Lichtmikroskop sichtbar wird. Das zugesetzte Nickelsulfat wird ebenfalls oxidiert und fällt als schwarzer Farbstoff aus, der das DAB-Signal verstärkt. Zur Kolo-kalisation eines Zielproteins mit anderen Proteinen wie z.B. spezifischen, zellulären Markern wurde eine Doppelfluoreszenz mit einem grünen (Alexa 488) und einem roten (Alexa 647) Fluorochrom durchgeführt, die im Anschluss mit einem Fluoreszenzmikroskop detektiert werden konnten. In beiden Fällen bestand die Möglichkeit, das erhaltene Signal mittels des Tyramid-Systems zu verstärken.

2.6.1 Vorbehandlung der Gewebeschnitte

Nach der Entparaffinierung in 3x 10min Xylol und 10min 100% Isopropanol erfolgte für 30min ein H_2O_2 -Block (0,15% in 100% Methanol, dient der Blockierung der endogenen Peroxidase) und anschließend die Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe (10min 100% Isopropanol, je 5min 96%, 80%, 70% Isopropanol). Nach ausreichendem Waschen in aq.bidest wurden die Schnitte zum Freilegen der Antigene (Denaturieren der Proteine) 15min bei ca. 95°C in einem Citratpuffer gekocht. Es folgte erneutes Waschen in aq.bidest und die Umrandung der einzelnen Schnitte mit PapPen (ermöglicht das Auftropfen verschiedener Antikörperkombinationen auf denselben Objektträger), anschließend für 30min ein Block mit bovinem Serumalbumin (BSA, 5% in PBS-ICC). Zum Abbinden des gewebeeigenen Biotin wurde zusätzlich für 20min mit einer 30%igen Avidin-Lösung (in 1% BSA/PBS-ICC) geblockt; die dabei übrigen Bindungsstellen anschließend durch 20min Inkubation mit einer 30%igen Biotin-Lösung (in 1% BSA/PBS-ICC) blockiert.

2.6.2 Primärantikörper

Die in 50%Glycerin/aq.bidest bei -20°C gelagerten Antikörper wurden entsprechend ihrer Verwendung (siehe Tabelle 2.6.1) in 1%BSA/ICC verdünnt und auf die Schnitte aufgetropft. Die Inkubation erfolgte in einer feuchten Kammer bei 16°C über Nacht und anschließenden 2h bei 37°C. Bei der gleichzeitigen Applikation zweier Primärantikörper für die Doppelfluo-

reszenz ist zu beachten, dass die Antikörper aus unterschiedlichen Donorspezies stammen, um Kreuzreaktionen bei der späteren Detektion durch den Sekundärantikörper auszuschließen. Bei den hier verwendeten Antikörpern handelt es sich ausschließlich um Immunglobuline der G-Familie (IgG).

Tabelle 2.6.1 Primärantikörper. AK-ID: Antikörper-Identifikation, DS: Donor-Spezies, rb: Kaninchen, gt: Ziege; ms: Maus; sh: Schaf, DAB: Verdünnung für Diaminobenzidin-Färbung, DF: Verdünnung für Doppelfluoreszenz. N.v. nicht verwendet.

AK-ID	Antigen	Hersteller / Katalog-Nr.	DS	DAB	DF
CD3	Cluster of Differentiation 3	DAKO / M7254	rb	1:3000	n.v.
ChAT	Cholin-Acetyltransferase	Chemicon / AB144P	gt	1:1000	1:500
Calb	Calbindin	Sigma Aldrich / C9848	rb	1:2000	n.v.
CGRP/Ny	Calcitonin gene-related peptide	Fred Nyberg (Upsalla, Swe)	rb	1:200.000	1:10.000
CGRP/07	Calcitonin gene-related peptide	Phoenix Pharma. / H-001-07	rb	1:8000	1:1000
CGRP/09	Calcitonin gene-related peptide	Phoenix Pharma. / H-001-09	rb	1:10.000	1:1000
CRLR	Calcitonin Receptor Like Receptor	McGregor (Marbug)	rb	1:2000	1:500
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein	Progen / GP52	gp	1:5000	1:1000
Iba1	Ionized calcium binding adaptor 1	Wako Pure / 091-19741	rb	1:1500	1:200
MAP2	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2	Chemicon / MAB3418	ms	1:200	1:200
NeuN	neuronaler Nucleus	Chemicon / MAB377B	ms	1:200	1:200
NF200	Neurofilament 200	Sigma Aldrich / N0142	ms	1:5000	1:500
NPY	Neuropeptid Y	Auspep / 85061	sh	1:3000	n.v.
Parval	Parvalbumin	Sigma Aldrich / P3088	rb	1:3000	n.v.
PACAP	Pituitary adenylcycl. activ. Protein	Progen / 16063	rb	1:20.000	1:2000
RAMP1	Receptor activity modifyind Protein 1	Santa Cruz / 19765	gt	1:diverse	n.v.
SOD1	Superoxid-Dismutase 1	Abcam / AB 20926	gt	1:15.000	1:2000
SP	Substanz P	Lee Eiden (Bethesda, USA)	rb	1:10.000	n.v.
TH	Tyrosinhydroxylase	Chemicon / AB1542	sh	1:1000	1:500
VIP	Vasoaktives intestinales Peptid	Lee Eiden (Bethesda, USA)	rb	1:10.000	n.v.
VACHT	vesikulärer Acetylcholintransporter	Lee Eiden (Bethesda, USA)	rb	1:5000	1:1000

2.6.2.1 Peroxidase-Färbung

Bei dieser Methode werden ausschließlich biotinylierte Sekundärantikörper (siehe unten) in Standardverdünnung (1:200 in 1% BSA/PBS-ICC) eingesetzt. Nach ausreichendem Auswaschen der Primärantikörper-Lösung (3x 5min aq.bidest, 10min PBS-ICC) wurden die Schnitte in 1% BSA/PBS-ICC äquilibriert, anschließend mit der Antikörper-Verdünnung betropft und 45min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Überreste der Sekundärantikörper-Lösung durch Waschen entfernt (3x 5min aq.bidest, 10min PBS-ICC) und der 30min bei Raumtemperatur vorinkubierte AB-Komplex (Vectastain Elite ABC-Kit) aufgetropft. Dieser enthält die Peroxidase und das zur Kopplung an das Biotin des Sekundärantikörpers notwendige Streptavidin. Da jeder Sekundärantikörper mehrere Biotine besitzt und auch jedes Streptavidin an mehrere Peroxidasen gekoppelt ist, entsteht durch diesen Schritt eine deutliche Verstärkung des später erhaltenen Farbsignals. Nach 30minütiger Inkubation bei 37°C erfolgte ausreichendes Auswaschen (wie oben) und anschließend die Färbung. Dazu wurden 100mg Diaminobenzidin und 600mg Nickelsulfat in 800ml PBS-ICC gelöst, filtriert und in ein lichtdichtes Gefäß überführt. Unter Lichtausschluss wurden die Schnitte 5min vorinkubiert und die Farbreaktion anschließend durch die Zugabe von 112µl 30% H₂O₂ gestartet. Nach exakt

8min wurde die Reaktion durch Überführung der Schnitte in aq.bidest abgestoppt. Nach 3x5min Waschen in aq.bidest erfolgte die Dehydrierung der Schnitte in der aufsteigenden Alkoholreihe (je 3x 5min 70%, 80%, 96%, 3x 100% Isopropanol, 3x 10min Xylol) und anschließendes Eindeckeln mit Eukitt-Medium.

Tabelle 2.6.2 Biotinlyierte Sekundärantikörper.

Biotinlyierte Sekundär-AK	Hersteller	Best.-Nr.	Verdünnung
Esel-anti-Kaninchen-IgG	Dianova GmbH (Hamburg)	711-065-152	1:200
Esel-anti-Maus-IgG	Dianova GmbH (Hamburg)	715-065-151	1:200
Esel-anti-Ziege-IgG	Dianova GmbH (Hamburg)	705-065-147	1:200
Esel-anti-Meerschwein-IgG	Dianova GmbH (Hamburg)	706-065-148	1:200
Esel-anti-Schaf-IgG	Dianova GmbH (Hamburg)	713-065-150	1:200

2.6.2.2 Doppelfluoreszenzmarkierung

Nach Auswaschen der Primärantikörper-Lösung erfolgte zunächst die Applikation des biotinylierten Sekundärantikörpers gegen den für die Alexa488-Markierung bestimmten Primärantikörper analog dem Vorgehen bei der Peroxidase-Färbung (siehe 2.6.3). Anschließend wurden Alexa488-gekoppeltes Streptavidin und der gegen den zweiten Primärantikörper gerichtete, Alexa647-gekoppelte Sekundärantikörper (beide 1:200) in 1% BSA/PBS-ICC gemischt und nach Auswaschen der ersten Sekundär-AK-Lösung (3x 5min aq.bidest, 10min PBS-ICC) und kurzem äquilibrieren in 1% BSA/PBS-ICC aufgetropft. Die Inkubation erfolgte für 2h bei 37°C. Nach gründlichem Waschen in 4x 5min aq.bidest wurden die Schnitte mit FluoroSafe eingedeckelt und zum Schutz der Fluoreszenz bei 4°C im Dunkeln gelagert.

Tabelle 2.6.3 Fluorochrom-gekoppelte Sekundärantikörper.

Fluorochrom-gekoppelte Sekundärantikörper	Hersteller	Best.-Nr.
AlexaFluor488-Streptavidin	MoBiTec (Göttingen)	S-11223
AlexaFluor647-Huhn-anti-Kaninchen-IgG	MoBiTec (Göttingen)	A-21443
AlexaFluor647-Huhn-anti-Maus-IgG	MoBiTec (Göttingen)	A-21463
AlexaFluor647-Esel-anti-Ziege-IgG	MoBiTec (Göttingen)	A-21448
AlexaFluor647-Ziege-anti-Meerschwein-IgG	MoBiTec (Göttingen)	A-21450

2.6.3 Tyramid-Signalamplifikation

Bei der Tyramid-Signalamplifikation (TSA) handelt es sich um ein Biotin- und Peroxidase-basiertes Detektionssystem zur bis zu 100fachen Verstärkung von Chromogen- oder Fluoreszenzsignalen in der Immunhistochemie, Immunzytochemie und nicht-radioaktiver *in situ*-Hybridisierung. Es erlaubt die ultrasensitive Detektion von geringen Mengen an Zielprotein

bzw. –mRNA oder eine deutliche Ersparnis an eingesetzter Menge Primärantikörper und damit die Reduktion eventueller unspezifischer Hintergrundsignale. In der vorliegenden Arbeit wurde ein TSA™ HRP Kit verwendet und bei gleichbleibender Primärantikörperkonzentration ausschließlich zur hochsensitiven Detektion schwacher Signale in der Immunhistochemie verwendet.

2.6.3.1 Funktionsprinzip

Vorraussetzung für die TSA ist eine im Detektionssystem vorhandene Meerrettich-Peroxidase (Horseradish-peroxidase, HRP), die entweder direkt an den verwendeten Sekundärantikörper gekoppelt ist oder über einen AB-Komplex (siehe 2.6.2.1) an einen Biotin-konjugierten Sekundärantikörper gebunden ist. In Anwesenheit von H₂O₂ oxidiert die HRP das in reduzierter, löslicher Form applizierte Tyramid und überführt es in eine „aktivierte“, reaktive Form. Diese ist unlöslich, fällt aus und bindet kovalent an die Tyrosinreste umliegender Proteine, die sich in unmittelbarer Nähe der HRP und demzufolge des Primärantikörpers und des Antigens befinden. Das Tyramid ist seinerseits mit einer Biotin-Markierung versehen, die im Anschluss mit Streptavidin detektiert werden kann, das entweder mit einer zweiten HRP zur Farbreaktion mit DAB/Ni oder für die Doppelfluoreszenz mit einem Chromogen (z.B. Alexa488) konjugiert ist. Durch diese zusätzliche Markierung umliegender Proteine mit dem jeweils verwendeten Detektionssystem kommt es zwar zu einem minimalen Verlust der Auflösung, doch können durch die Vervielfältigung des Signals durch Tyramid selbst minimale Mengen an Antigen sichtbar gemacht werden.

2.6.3.2 Anwendung

Die Tyramid-Signalamplifikation wurde wie folgt in die Protokolle der Immunhistochemie integriert: Bis zur Applikation des Sekundärantikörpers wurden die Schnitte behandelt wie oben beschrieben, wobei der gegen das zu verstärkende Antigen gerichtete Primärantikörper mit einem biotinlyiertem Sekundärantikörper detektiert wurde. Im Anschluss an das Auswaschen der Sekundärantikörper-Lösung mit 3x10min aq.dest. erfolgte eine Äquilibration der Gewebe in TN-Puffer (3x5min) und die Verstärkungsreaktion. Dazu wurde Tyramid (1:50 in Amplifizierungspuffer) auf die Gewebeschnitte aufgetropft und 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abwaschen der Tyramidlösung (2x 5min TN-Puffer) und der Rückführung in Wasser (2x 5min aq.dest) wurden die Schnitte in 10min PBS-ICC gewaschen und im Anschluss in 1%BSA in PBS-ICC für den abschließenden Detektionsschritt äquilibriert. Dieser erfolgte für die Peroxidase-Farbreaktion durch eine erneute Inkubation mit AB-Komplex (30min bei 37°C) und anschließender DAB/Ni-Färbung

(siehe oben), und für die Doppelfluoreszenz die Inkubation mit Alexa488-konjugiertem Streptavidin (2h bei 37°C), mit dem wie oben der Alexa647-direktgekoppelte Sekundärantikörper gegen den zweiten Primärantikörper koappliziert wurde.

2.6.4 Markierung neuromuskulärer Endplatten mit α -Bungarotoxin

Bei dem Polypeptid α -Bungarotoxin handelt es sich um einen Bestandteil des Gifts der *Bungarus multicinctus*, einer südostasiatischen Natter aus der Familie der Elapiden. Es bindet hochspezifisch an den nikotinischen Achetylcholinrezeptor und kann daher zur Markierung der neuromuskulären Endplatten verwendet werden.

Um den Innervationsstatus verschiedener Muskeln bei ALS-kranken Mäusen zu untersuchen, wurde die Markierung der neuromuskulären Endplatten mit einer Immunfluoreszenz gegen den vesikulären Achetylcholintransporter (VACHT), einem spezifischen Marker für die den Muskel innervierenden, cholinergen Fasern der Motorneurone, kombiniert:

Die unfixierten, 14 μ m dicken Kryoschnitte wurden 15min an der Luft getrocknet, mit PapPen umrundet und anschließend in 4% Paraformaldehyd fixiert (15min RT), 3x5min mit PBS-ICC gewaschen und anschließend in PBS/ICC + 0,5% Triton permeabilisiert. Nach Auswaschen des Detergenz (2x5min PBS-ICC) wurden die Schnitte in Blockierlösung überführt (5%BSA in PBS-ICC) und 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Abbinden des gewebeeigenen Biotin wurde zusätzlich für 20min mit einer 30%igen Avidin-Lösung (in 1% BSA/PBS-ICC) geblockt, die dabei übrigen Bindungsstellen anschließend durch 20min Inkubation mit einer 30%igen Biotin-Lösung (in 1% BSA/PBS-ICC) blockiert. Es folgte die Applikation des VACHT-Primärantikörpers (1:2000 in 1% BSA/PBS-ICC) und nach dem Auswaschen der Primärantikörperlösung mit 3x 5min PBS-ICC für 2h bei 37°C die Koapplikation des Alexa488-gekoppelten Sekundärantikörpers (1:200, AlexaFluo488-Esel-anti-Kaninchen, MoBiTec, Göttingen), mit dem Alexa647-konjugiertem α -Bungarotoxin (1:1000, Invitrogen, Eugene, USA) in 1% BSA/PBS-ICC. Nach gründlichem Auswaschen der Fluorochrom-Lösung (4x5min PBS) wurden die Schnitte nach kurzem Eintauchen in aq.dest in FluoroSafe eingedeckelt und bei 4°C im Dunkeln gelagert.

2.6.5 Qualitative Auswertung

2.6.5.1 Immun-Peroxidase-Färbungen

Die Auswertung der DAB-Nickelfärbungen erfolgte am Lichtmikroskop AX 70 (Olympus). Dabei bestand zum einen die Möglichkeit der Digitalisierung der Gewebeschnitte mittels der SPOT RT Slider-Kamera und der dazugehörigen Software SPOT Image Analyser (Version 3.4). Zur qualitativen Darstellung der unterschiedlichen Immunfärbungen wurden dabei Bildausschnitte von Interesse in unterschiedlichen Vergrößerungen (4-100x) aufgenommen und mit einem automatisch kalibrierten Längenstandard versehen.

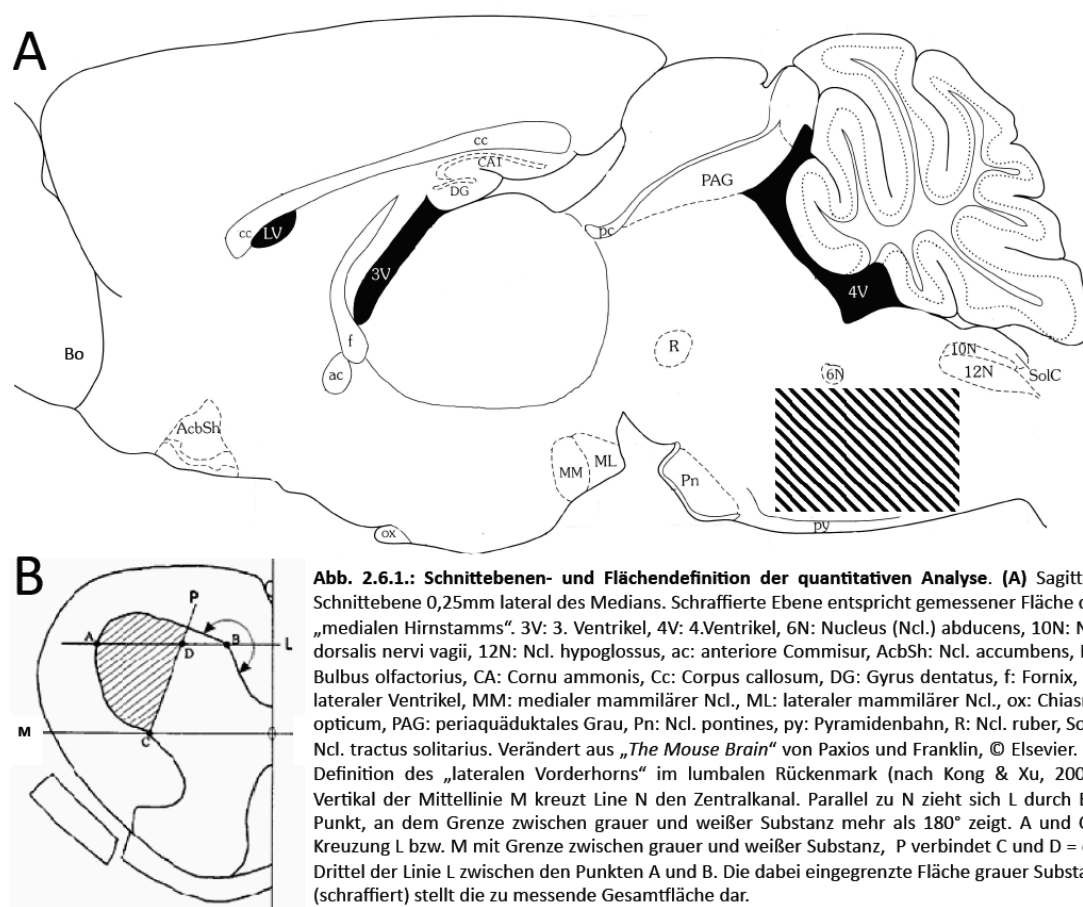
Zum anderen wurde eine repräsentative Auswahl gegen unterschiedliche Antigene gefärbter Gehirnschnitte auf einem Leuchttisch platziert, mittels einer Digitalkamera eine Gesamtaufnahme des Gewebes erstellt und diese von der MCID EliteTM Software anhand der jeweiligen optischen Dichte der Färbung in eine Falschfarbengraphik umgewandelt. Dieses Verfahren ermöglichte einen besseren Rückschluss auf die Farbdichte und damit des Antigenvorkommens in verschiedenen Gehirnarealen bzw. die übersichtliche Darstellung einer eventuellen Veränderung der Antigenverteilung und -menge über den Zeitverlauf der ALS-Erkrankung.

2.6.5.2 Doppelfluoreszenzen

Die Dokumentation der Immunfluoreszenzen erfolgte grundsätzlich mittels eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops (Olympus), bei dem beide Fluoreszenzen (A488 = grün, A647 = rot) in schnellem Wechsel angeregt und erfasst werden konnten. Eine spezielle Software (FluoView) visualisierte die Bilder der am Mikroskop angeschlossenen CCD-Digitalkamera und erstellte automatisch das Überlappungsbild beider Fluoreszenzen inklusive Berechnung der Längenmaßstäbe entsprechend der Objektiv- und Zoom-Einstellungen. Waren die Fluoreszenzen überlagert, wurden entsprechende Bereiche des Bildes gelb dargestellt. Durch diese Farbgebung konnten Rückschlüsse gezogen werden, ob die immunmarkierten Strukturen kolo-kalisiert (gelb) oder unabhängig voneinander im Gewebe vorlagen (grün bzw. rot). Bildausschnitte von Interesse wurden in unterschiedlichen Vergrößerungen (Objektivvergrößerung 4x-60x + digitaler Zoom bis zu 2,5x) aufgenommen und dienten der Darstellung der Lokalisation markierter Proteine im Gewebe im Vergleich zu Strukturmarkern (z.B. für Neuriten oder Gliazellen) oder anderen Proteinen von Interesse.

2.6.6 Quantitative Auswertung und statistische Analyse

Zur Quantifizierung verschiedener, ALS-relevanter histopathologischer Ereignisse wie die Degeneration der Motoneurone, Neuroinflammation und Lymphozyteninfiltration wurden im lumbalen Rückenmark das „laterale Vorderhorn“ und im Gehirn der „mediale Hirnstamm“ (genaue Definition siehe Abb. 2.6.1), als repräsentative Areale gewählt und gegen die jeweiligen zelltypspezifischen Antigene (siehe unten und Tabelle 2.6.1) immunmarkiert.



Um statistisch aussagekräftige Werte zu erhalten wurden für sämtliche im Folgenden aufgeführten Erhebungen mindestens 4 Messwerte pro Tier und mindestens 4 Tiere pro Genotyp und Stadium ausgewertet, die genauen n-Zahlen finden sich an den entsprechenden Stellen des Ergebnisteils. Eine Signifikanzanalyse wurde in allen Fällen durchgeführt mit einer ein-faktoriellen ANOVA (*analysis of variance*, Varianzanalyse) und anschließendem Bonferroni-Test mit getrennter Betrachtung der Unterschiede i) zwischen Tieren gleichen Genotyps verschiedener Stadien bzw. verschiedenen Alters (Faktor = Stadium bzw. Alter), ii) zwischen transgenen und nichttransgenen Tieren desselben Stadiums/Alters und Genotyps bezüglich

des untersuchten Neuropeptids (Faktor = SOD1), sowie iii) zwischen Knockout- und Wildtyp-Tieren gleichen Stadiums/Alters und Genotyps bezüglich des SOD1-Transgens (Faktor = PACAP bzw. RAMP1). Die Anzahl der verschiedenen Vergleiche im Bonferroni-Test wurde dabei innerhalb einer Untersuchung nicht variiert, so dass das sich ergebende Signifikanzniveau stets dasselbe und damit vergleichbar blieb. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden ermittelt mit der Kalkulations-Software Excel, die statistische Analyse durchgeführt mit GraphPad Prism.

2.6.6.1 Motorneurone

Da sich eine korrekte, automatisierte Erfassung von Motorneuronen selbst mit verschiedener Spezialsoftware schwierig gestaltete, erfolgte die Auszählung sowohl der Doppelfluoreszenzen als auch der Einfachmarkierungen per Hand. Die Markierung der Motorneurone erfolgte in beiden Fällen mit dem spezifischen Marker ChAT (Cholinacetyltransferase). Um eine Doppelerfassung der Neurone zu verhindern, wurden nur Schnitte gefärbt, die in der Schnittebene mind. 20 μ m voneinander entfernt lagen, und nur jene Neurone gezählt, deren Nuclei klar und deutlich angeschnitten war. Außerdem wurden ausschließlich gesunde Motorneurone, d.h. solche mit rundem Zellkern und deutlich erkennbaren, klaren Zellgrenzen, gewertet.

2.6.6.2 Astroglia

Auch hier gestaltete sich eine automatisierte Erfassung von Einzelzellen schwierig, da Astrozyten v.a. im aktivierten Zustand (wie bei der für die ALS charakteristischen Neuroinflammation der Fall) ein Synzytium bilden. In der verwendeten spezifischen Immunmarkierung gegen GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) sind die Zellen über ihre Fortsätze miteinander verbunden und lassen sich bei einer Erfassung über die optische Dichte nicht durch einen einfachen Algorithmus voneinander trennen. Da aber auch andere morphologische Veränderungen wie z.B. ein Anschwellen und damit eine Flächenzunahme der Zellkörper für eine Aktivierung der Astrozyten und damit einen Unterschied zwischen ALS-kranken und gesunden Tieren relevant sind, wurde statt einer Einzelzellzählung der Anteil GFAP-immunoreaktiver Fläche an der Gesamtfläche der ausgewählten Gehirn- bzw. Rückenmarksareale bestimmt.

Zu diesem Zweck wurden alle auszuwertenden Schnitte mit der SPOT RT Slider-Kamera mit denselben Belichtungseinstellungen (Vergrößerung 10x bei Gehirnschnitten, 20x bei Rückenmark, Lichtintensität: 9.0, Intensitätsfilter 3, Belichtungszeit 3sec) digitalisiert und mit der Bildbearbeitungs-Software ImageJ wie folgt analysiert: Zunächst wurde mittels eines Längenstandards die horizontale und vertikale Pixelzahl/cm ermittelt, um eine korrekte Berechnung der gemessenen Flächen zu ermöglichen. Anschließend wurde anhand mehrerer reprä-

sentativer Gewebe der optimale Schwellenwert der optischen Dichte ermittelt, bei dem alle eindeutig immunoreaktiven Flächen erfasst wurden. Unter manueller Definition der zu messenden Fläche (siehe Abb.) wurde mittels des zuvor festgelegten Schwellenwerts der prozentuale Anteil immunreaktiver Fläche aller Gewebeschnitte ermittelt.

2.6.6.3 Mikroglia

Die Quantifizierung der Mikroglia erfolgte automatisiert analog des Verfahrens für Astroglia (siehe oben), die spezifische Markierung des Zelltyps mittels Iba1 (siehe Tabelle 2.6.1). Aufgrund der fehlenden Verbindung zwischen diesen Zellen war in diesem Fall auch die automatisierte Erfassung der Einzelzellzahl möglich. Als Zellen definiert und erfasst wurden alle immunoreaktiven Partikel, die aus mindestens 50 zusammenhängenden Pixeln bestanden.

2.6.6.4 Lymphozyten

Die Erhebung der Zellzahl eingewanderter Lymphozyten erfolgte automatisiert analog des Vorgehens für Mikroglia, die zelltypspezifische Markierung mittels des Oberflächenmarkers CD3 (siehe Tabelle 2.6.1).

2.7 *In situ*-Hybridisierung (ISH)

Bei der *in situ*-Hybridisierung (Melton et al., 1984) handelt es sich um eine etablierte Methode zum Nachweis der zellulären Lokalisation beliebiger mRNA-Sequenzen im Gewebe (*in situ*). Die Technik basiert auf dem Einsatz sogenannter Ribosonden (mRNA-Sonden), die durch *in vitro*-Transkription hergestellt und dabei für eine nachfolgende Detektion markiert werden. Die Markierung erfolgt entweder durch den Einbau von Fluoreszenz-, radioaktiv- oder Digoxigenin-(DIG)-markierter Nukleotide in die mRNA, die im Anschluss durch entsprechende Detektionsmethoden im Gewebe nachgewiesen werden kann. Die *in vitro*-Synthese der Ribosonden basiert auf einer spezifischen DNA-Matrize, in der der zu detektierenden mRNA-Sequenz der Promotor einer viralen RNA-Polymerase (z.B. SP6, T3 oder T7) vorgeschaltet ist. Bei der Transkription, d.h. der Herstellung der Matrize, ist zu beachten, dass zur Hybridisierung mit der Ziel-mRNA die entstehende Ribosonde die komplementäre Basensequenz („*antisense*“-Sonde) aufweisen muss. Als Negativ-Kontrolle dient nach allgemeinem Konsens die nicht zur Hybridisierung fähige Ribosonde mit zur Ziel-mRNA analoger Basensequenz („*sense*“-Sonde). Die zur ausreichenden Abdeckung der Ziel-mRNA optimale Matrizenlänge beträgt erfahrungsgemäß 300-900 Basenpaare (bp), die der Ribosonden zur optimalen Penetration ins Gewebe ca. 250-300bp. Die Reduktion der Sondenlänge erfolgt durch eine im Anschluss an die reverse Transkription durchgeführte Fragmentierung der Ribosonde durch alkalische Hydrolyse wird. Dabei greift hinzugegebenes Na₂CO₃ die OH-Gruppen der RNA-Nukleotide an zufälligen Stellen an und spaltet den RNA-Strang, so dass sich in Abhängigkeit der Reaktionsdauer die durchschnittliche Fragmentlänge der Ribosonde durch mehrfache Strangspaltungen reduziert (Angerer et al., 1987).

Nach der Hybridisierung der zu untersuchenden Gewebe mit der Ribosonde werden radioaktiv-markierte Sonden mittels Autoradiogrammen detektiert, d.h. entweder mit einem auf die Gewebe aufgelegten Röntgenfilm oder durch das Aufziehen einer Fotoemulsion direkt auf die Objektträger. Die entstehende Schwärzung des Röntgenfilms bzw. der Fotoemulsion auf dem Gewebe zeigt die Lokalisation der hybridisierten Sonde an. Bei DIG-markierten Ribosonden erfolgt eine Immunodetektion mittels eines Antikörpers gegen Digoxigenin (DIG), an dessen Fc-Teil eine Alkalische Phosphatase gekoppelt ist. Dieses Enzym setzt die Chromogene NBT (Nitroblau-Tetrazoliumchlorid) und BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-indoxylphosphat) durch mehrfache Oxidation zunächst in einen roten und einen gelb-braunen Farbstoff (Mono-Formazan bzw. Indoxyl), später in blaue Farbstoffe (Di-Formazan bzw. Indigo) um. Die Farbstoffe schlagen sich auf dem Gewebe nieder und lassen somit einen Rückschluss auf die zelluläre Lokalisation der hybridisierten Sonden zu. Durch die Verwendung mehrerer, mit unterschiedlichen Methoden markierten Ribosonden lassen sich parallel mehrere Ziel-mRNAs in dem-

selben Gewebe lokalisieren, was den Einsatz von zelltypspezifischen mRNAs als Marker oder Aussagen über die Koexpression verschiedener mRNAs durch dieselben Zellen ermöglicht. Durch die Stärke der jeweiligen Sondensignale lässt sich bedingt auch eine Quantifizierung der Expressionslevel vornehmen, jedoch ist diese Methode im Vergleich zu anderen Techniken, wie z.B. der quantitativen RT-PCR, weniger sensitiv und nur für semiquantitative, vergleichende Aussagen zu gebrauchen (für detaillierte Informationen siehe Schafer et al., 1994).

2.7.1 Ermittlung optimaler Primersequenzen

Zur Ermittlung der optimalen, spezifischen Sequenzen einer Ribosonde wurden die mRNA-Sequenzen der jeweiligen Zielproteine der Maus aus den publizierten Sequenzen der NCBI-Datenbank bezogen und mittels Sequenzvergleich durch die NCBI-Software BLAST auf ihre Homologie mit anderen Sequenzbereichen durchsucht. Innerhalb der Bereiche ohne Homologien und damit Protein-spezifischen Sequenzen der mRNA erfolgte mittels einer speziellen Software (Primer 3) die Suche geeigneter Primersequenzen nach folgenden Kriterien: Schmelztemperatur (58-62°C), minimale/maximale Basenpaaranzahl (18-22bp) und Länge des entstehenden PCR-Produktes (250-900bp). Nach Möglichkeit wurde der gesamte spezifische Bereich der Ziel-mRNA abgegriffen und eine Überlappung von Intron/Exon-Übergängen bevorzugt, da dies die Hybridisierung der Ribosonde mit eventuell im Gewebe vorliegenden, einsträngigen DNA-Sequenzen (enthalten Introns) verhindert. Die anschließende Synthese der jeweiligen gewünschten Primerpaare erfolgte durch die Firma MWG Biotech, eine Auflistung sämtlicher hergestellter Ribosonden mit Angabe verwendeter mRNA- und Primer-Sequenzen sowie den resultierenden Matzritzengrößen findet sich in Tabelle 2.7.1.

Tabelle 2.7.1: Primersequenzen der Ribosonden.

Zielgen	NCBI-Accession	forward-Primer (3'-5')	reverse-Primer (3'-5')	Ribosonde
α CGRP	NM 001033954	gta taa gaa agg ctg atg aa gac aca	ggc agt gtt tca tat ccc ctt g	251bp
β CGRP	NM 054084	taa aca acc cga tgt gaa ggc	aac aaa gct gct acc att ggc t	251bp
CRLR	NM 018782	aat cca agg tca cag gtt gc	gcc cat cag gta gag atg ga	811bp
RAMP1	NM 178401.3	gga ctc tca tcc agg agc tg	gtc tga ggg agc aaa gaa cg	400bp
RAMP2	NM 019444.2	ctg agg aca gcc ttg tgt ca	cac agg tct gtg gga agg at	489bp
RAMP3	NM 019511.3	gag aca ggg atg ctg gag ag	cct ctc tgg cca agt gta gc	765bp
PACAP	MGI 105094	tta cga cca gga cgg aaa cc	aac agc tca ggc gaa ttt tca	701bp
PAC-1	NM 007407.3	cct atg gct att gct atg cac tc	aga gta atg gtg gat agt tct ga	1084bp
VPAC1	NM 011703.4	ggg ggc cat cct cta ctg ctt c	cct ccc cag gct ttt atg tca g	1171bp
VPAC2	NM 009511.2	agt gct gct ggg ttt gac ata	ata ggc tgt gcc ag acta gg	985bp

2.7.2 Herstellung einer DNA-Matrize

Um eine DNA-Matrize zur späteren *in vitro*-Transkription (siehe 2.7.3) herzustellen musste zunächst RNA aus einem das Zielgen enthaltenden Gewebe isoliert (siehe 2.5.1.2) und in cDNA umgeschrieben (siehe 2.5.1.6) werden. Im Anschluss erfolgte eine PCR (siehe 2.5.1.7) mit den für die spezifische Ribosonde generierten Primern (siehe 2.7.1) und die Ligation des entstehenden Produkts in einen Plasmidvektor (siehe 2.5.2). Nach Transformation, Klonierung und Mini- bzw. Maxi-Präp (siehe 2.5.3) und anschließender Linearisierung des Plasmids (siehe 2.5.4.2) erhält man die fertige DNA-Matrize. Diese besitzt nun je einen der dem Zielgen analogen Basensequenz vor- beziehungsweise nachgeschalteten Promotor für eine virale RNA-Polymerase (Sp6 oder T7), die – je nach Orientierung des *Inserts* innerhalb des Vektors – die Transkription des *sense*- oder *antisense*-Stranges initiieren.

Zielgen	Insert	Vektor	Stamm	Transformation	Orientierung
VACHT		pGEMT	TOP10	Elektroporation	T7-antisense
α CGRP	251bp	pCR-TOPO	TOP10	Elektroporation	T7-antisense
β CGRP	251bp	pCR-TOPO	TOP10	Elektroporation	T7-antisense
CRLR	811bp	pGEMT	NEB10 β	chemisch	Sp6-antisense
RAMP1	400bp	pGEMT	NEB10 β	chemisch	T7-antisense
RAMP2	489bp	pGEMT	NEB10 β	chemisch	Sp6-antisense
RAMP3	765bp	pGEMT	NEB10 β	chemisch	Sp6-antisense
PACAP		pGEMT	TOP10	Elektroporation	T7-antisense
PAC-1		pGEMT	TOP10	Elektroporation	Sp6-antisense
VPAC1		pGEMT	TOP10	Elektroporation	Sp6-antisense
VPAC2		pGEMT	TOP10	Elektroporation	T7-antisense

2.7.3 Synthese von mRNA-Sonden durch *in vitro*-Transkription

Bei der *in vitro*-Transkription handelt es sich um die Umschreibung eines vorgelegten DNA-Strangs in einen komplementären RNA-Strang. Anders als bei der PCR werden hier also keine DNA-Polymerase und Desoxi-Nukleotide (dNTPs), sondern eine (meist virale) RNA-Polymerase und RNA-Nukleotide (NTPs) eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit dient die *in vitro*-Transkription ausschließlich der Herstellung einer radioaktiv- oder Digoxigenin-markierten Ribosonde. Zu diesem Zweck werden in beiden Fällen speziell markierte Nukleotide eingesetzt, und zwar UTP, bei dem ein Stickstoffmolekül des Purin-Rings entweder durch ein Isotop des Schwefels ausgetauscht (^{35}S -UTP), oder mit Digoxigenin konjugiert (DIG-UTP) wurde. Nach der Hybridisierung (siehe 2.7.4) lässt sich die radioaktive Sonde mittels Autoradiogrammen (siehe 2.7.5.1), die Dig-markierte Ribosonde über eine immunhistochemische Färbung (siehe 2.7.5.3) im Gewebe detektieren.

2.7.3.1 Synthese einer radioaktiv-markierten Ribosonde

Für die so genannte ^{35}S -Markierung einer Ribosonde wurden $0,5\mu\text{g}$ DNA-Matrize (siehe 2.7.2) und $125\mu\text{Curie}$ ^{35}S -UTP in der *SpeedVac* (Vakuumzentrifuge mit Kühlfalle) eingedampft und in $2,5\mu\text{l}$ Reinstwasser resuspendiert. Anschließend wurde eine Mischung nicht-markierter Nukleotide (CTP/ATP/TTP), die RNA-Polymerase und ein RNase-Inhibitor dazugegeben, gut gemischt und 90min bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

Ansatz ^{35}S -Markierung:	<u>Reagenz</u>	<u>Volumen</u>
	DNA-Matrize ($0,2\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	$2,5\mu\text{l}$ (= $0,5\mu\text{g}$)
	^{35}S -UTP ($13\mu\text{M}$)	$7,5\mu\text{l}$ (= $125\mu\text{Curie}$)
	Reinstwasser Resuspendierung	$2,5\mu\text{l}$
	10x Transkriptionspuffer	$0,5\mu\text{l}$
	DTT (100mM)	$0,5\mu\text{l}$
	NTP-Mix ohne UTP (5mM)	$0,5\mu\text{l}$
	RNase-Inhibitor	$0,25\mu\text{l}$
	RNA-Polymerase (T7 oder Sp6)	$0,5\mu\text{l}$
	Reinstwasser	$0,25\mu\text{l}$

Um die im Ansatz enthaltenen DNA-Fragmente zu entfernen wurden diese durch Zugabe von $1\mu\text{l}$ RNase-freier DNaseI enzymatisch abgebaut (15min , 37°C). Es erfolgte ein Auffüllen der Ansätze mit Reinstwasser auf $20\mu\text{l}$ und durch die anschließende Zugabe von $20\mu\text{l}$ Na_2CO_3 wurde die alkalische Hydrolyse eingeleitet. Die Dauer der bei 60°C stattfindenden Reaktion hängt dabei von der Länge der eingesetzten DNA-Matrize ab und berechnet sich wie folgt:

$$\text{Berechnung Hydrolysezeit: } t = (L_o - L_f) / (k * L_o * L_f)$$

t = Inkubationszeit in Minuten
 L_o = Ausgangslänge DNA-Matrize [kb]
 L_f = gewünschte Fragmentlänge [kb],
 k = Konstante = $0,11$

Nach Ablauf der jeweiligen Reaktionszeit wurde alkalische Hydrolyse durch Zugabe von $2\mu\text{l}$ 10%iger Essigsäure gestoppt und die Ansätze mit $28\mu\text{l}$ Reinstwasser aufgefüllt. Zur späteren Kontrolle des prozentualen Einbaus radioaktiver Nukleotide und der Ermittlung des entsprechenden Endvolumens der Sondenlösung (siehe unten) wurden $1,4\mu\text{l}$ des Ansatzes entnommen und in ein Szintillationsröhrchen gegeben („vorher“-Wert), im Anschluss erfolgte die Aufreinigung der Ribosonde über Micro Bio-Spin P30 Säulen (BioRad). Die Reinigungssäulen wurden gründlich geschüttelt und durch Abzentrifugation des TRIS-Puffers (2min , $3,6\text{rpm}$) aktiviert. Anschließend wurde der Transkriptionsansatz auf die Säulen gegeben und 4min bei 3600rpm abzentrifugiert. Aus dem Durchfluss wurden erneut $1,4\mu\text{l}$ entnommen, in ein Szintillations-Röhrchen gegeben („nachher“-Wert) und das verbleibende Elutionsvolumen

des Transkriptionsansatzes ermittelt. Die entnommenen „Vorher“- und „Nachher“-Proben wurden mit 5 µl Szintillationsflüssigkeit versetzt und im Szintillationszähler die jeweilige Aktivität gemessen. Anschließend wurde aus den erhaltenen Werten die zur Verdünnung notwendigen Mengen an Hybridisierungspuffer (90% des Endvolumens), 1M DTT (2% des Endvolumens) und Reinstwasser ermittelt, um die Sonde auf eine finale Aktivität von 50.000 dpm/µl einzustellen (Berechnung des Endvolumens siehe unten). Die fertigen Radioaktiv-Sonden wurden entweder sofort auf die zu hybridisierenden Schnitte aufgetropft oder bis zur Verwendung (maximal 3 Monate nach Herstellung) bei -80°C gelagert.

Berechnung von prozentualem Einbau und Endvolumen der ³⁵S-Markierung:

$$\text{Einbau [\%]} = (A_{\text{pre}} \cdot \text{EV} \cdot 100) / (A_{\text{post}} \cdot \text{EV})$$

A_{pre} = Aktivität vor Aufreinigung [dpm/µl]

A_{post} = Aktivität nach Aufreinigung [dpm/µl]

EV = Elutionsvolumen [µl]

$$\text{Endvolumen [\mu l]} = A_{\text{post}} \cdot \text{EV} / \text{Soll}$$

Soll = Sollwert = 50.000dpm/µl

2.7.3.2 Synthese einer DIG-markierten Ribosonde

Um aus der vorliegenden DNA-Matrize mittels *in vitro*-Transkription eine Digoxigenin-markierte mRNA-Sonde herzustellen, wurde der Transkriptionsansatz aus Matrize, DIG-markierten Nucleotiden, die zur Synthese des jeweiligen Stranges („sense“ oder „antisense“) benötigte RNA-Polymerase (Sp6 oder T7) und einem RNase-Hemmer 2h bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

Ansatz DIG-Markierung:	<u>Reagenz</u>	<u>Volumen</u>
	DNA-Matrize (0,2µg/µl)	1µg
	10x Transkriptionspuffer	2µl
	10x DIG-Labeling Mix	2µl
	RNA-Polymerase (T7 oder Sp6)	2µl
	RNase Inhibitor	1µl
	H2O Braun (Reinstwasser)	ad 20µl

Zum Verdau der DNA-Matrize wurde anschließend 1µl RNase-freie DNaseI (10U/µl) zugegeben und 15min bei 37°C inkubiert. Zur Kontrolle des Erfolges der Transkription wurde 1µl des Ansatzes auf ein Gel aufgetragen, um zum einen die Bandengröße des entstandenen mRNA-Fragmentes zu überprüfen und um zum anderen die mRNA-Menge grob abzuschätzen. Bei Bedarf konnte an dieser Stelle eine alkalische Hydrolyse durchgeführt werden, um

die durchschnittliche Fragmentlänge der Ribosonde auf die Optimallänge von 200-250bp zu reduzieren. Verfahren wurde dabei analog dem Vorgehen beim Bau einer ³⁵S-markierten Ribosonde (siehe 2.7.3.1). Anschließend wurde der Transkriptionsansatz zur RNA-Fällung mit aq.bidest auf 100µl aufgefüllt und 1µl Lithiumchlorid (1/10 Volumen) und 330µl eiskaltes 100% EtOH (3x Volumen) hinzugegeben und gründlich gemischt. Nach 2h Inkubation bei -70°C erfolgte eine Zentrifugation bei 12.000g und +4°C, anschließend wurde der Überstand verworfen und das *Pellet* in 200µl eiskaltem 70% EtOH resuspendiert. Nach kurzer Inkubation wurde erneut 15min bei 12.000g und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das *Pellet* 20-30min an der Luft getrocknet. Abschließend wurde das *Pellet* in 50µl Aq.bidest gelöst, die RNA-Konzentration mittels Spektrometrie (siehe 2.5.4.1) bestimmt und durch Zugabe entsprechender Mengen aq.bidest auf 0,2µg/ml eingestellt. Bis zur weiteren Verarbeitung konnte die DIG-markierte mRNA-Sonde bei -70°C aufbewahrt werden. Zur Hybridisierung (siehe 2.7.4.2) wurde die Ribosonde aufgetaut und 1:200 mit Hybridisierungspuffer auf eine finale Konzentration von 0,5ng/ml verdünnt.

2.7.4 Hybridisierungsverfahren

2.7.4.1 Prähybridisierung

Zur Optimierung der Hybridisierung der Ribosonde mit gewebeeigener RNA und zur Reduktion von Hintergrundsignalen wurden die Gewebe einer Vorbehandlung unterzogen (=prähybridisiert). Die bei -80°C gelagerten Kryoschnitte wurden 15-20min an der Luft getrocknet und für 60min bei RT in 4% PFA/PBS fixiert. Nach mehreren Waschschritten (3x10min PBS) erfolgte die Permeabilisierung der Gewebe durch 10minütige Inkubation in 0,4% Triton-X100. Nach kurzem Auswaschen der Tritonlösung (5min PBS, 1min aq.bidest) erfolgte die Acetylierung der genomischen DNA (verhindert eventuelles Binden der Ribosonde an einsträngige DNA) in TAE-Puffer. Dazu wurden die Schnitte 1min in der Lösung äquilibriert und nach Zugabe von 1,25ml/500ml Acetanhydrid weitere 10min unter starkem Rühren inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte nach Auswaschen des TAE-Puffers (5min PBS, 1min aq.bidest) durch kurzes Überführen in 50% und 70% Ethanol (je 30sek) dehydriert und für 20-30min an der Luft getrocknet. So vorbereitet wurden die Gewebe entweder sofort hybridisiert oder bei -20°C gelagert.

2.7.4.2 Hybridisierung

Die prähybridisierten Gewebeschnitte wurden (ggf. nach Auftauen und Lufttrocknung) mit einer ausreichenden Menge der gewünschten Sonde betropft (DIG-Sonde: 1ng/ml, Radioaktivsonde: 50.000dpm/μl, ca. 30μl Hybridisierungsmix pro cm² Deckgläschen) und eingedec-kelt. Die Hybridisierung erfolgte durch 18-20h Inkubation bei 60°C in feuchten Kammern mit in 50% Formamid getränkten Tüchern.

2.7.4.3 Posthybridisierung

Zum Entfernen nicht-hybridisierter Ribosonden und damit zur Reduktion von Hintergrundsi-gnalen wurden die hybridisierten Schnitte einer Nachbehandlung unterzogen (=posthybridisiert). Dazu wurden die Deckgläschen in 2x SSC abgelöst und entfernt, die Schnitte anschließend für je 10min in 2x und 1x SSC gewaschen. Zum enzymatischen Abbau einzelsträngiger (= nicht hybridisierter) mRNA wurden die Schnitte 60min bei 37°C in RNase-Puffer inkubiert, danach in SSC-Lösungen mit absteigender Konzentration (1x, 0,5x, 0,2x) für je 15min gewaschen. Zum Abschmelzen unspezifisch gebundener Ribosonden erfolgte eine Inkubation der Schnitte für 60min in 60°C heißem 0,2x SSC. Abschließend wurden die Gewebe nochmals 15min in 0,2x SSC sowie für 15min in aq.bidest gewaschen. Bei einer Einzelhybridisierung mit radioaktiven Sonden erfolgte durch kurzes Überführen in 50% und 70% Ethanol (je ca. 1min) zusätzlich eine Dehydrierung und anschließende Lufttrocknung, bei DIG-markierten Sonden entfiel dies und die Schnitte wurden aus dem Wasser heraus an der Luft getrocknet.

2.7.5 Detektion der Ribosonden

2.7.5.1 Detektion der Radioaktivsignale durch Röntgenfilm-Autoradiogramme

Zur Beurteilung der Sondenaktivität und deren Verteilung auf dem Gewebe wurden Autora-diographiefilme in Abhängigkeit der erwarteten Signalstärke für 24-72h den radioaktiv-markierten (=hybridisierten) Gewebeschnitten in einer Autoradiographie-Kassette exponiert, wobei zur Kontrolle Radioaktivstandards beigelegt wurden. Die Entwicklung der Röntgen-filme erfolgte unter Rotlicht für 4min in Entwickler (Kodak), das Abstoppen der Entwick-lungsreaktion durch kurzes Eintauchen in Leitungswasser (30-60s) und die Fixierung für 10min in Fixierer (Kodak). Anschließend wurden die Filme 10-15min in fließendem Wasser gespült, für einige Minuten in Netzmittel (verhindert Trockenflecken) gebadet und 30-60min im Wärmeschränk getrocknet.

2.7.5.2 Detektion der Radioaktivsignale durch Gewebe-Autoradiogramme

Um die radioaktiven Sondensignale konkreten Regionen und Einzelzellen im Gewebeschnitt zuordnen zu können, wurden Gewebe-Autoradiogramme hergestellt, bei denen eine direkte Beschichtung der Objektträger mit Fotoemulsion die Signale unmittelbar über dem Schnitt (also ohne räumliche Ausbreitung der Strahlung und damit Verwischen des Signals) sichtbar macht. Die Fotoemulsion NTB-2 (Kodak) wurde unter Lichtausschluss bzw. bei Rotlicht durch Erwärmung auf 42°C verflüssigt, 1:2 mit Reinstwasser verdünnt und die radioaktiv markierten Objektträger zur gleichmäßigen und blasenfreien Beschichtung langsam in die Emulsion eingetaucht. Nach Kontrolle auf Luftblasen wurden die Objektträger zum Abfließen überflüssiger Emulsion in senkrechter Stellung und unter Lichtausschluss über Nacht getrocknet, wobei eine Schale mit Silikakörnern optimalen Wasserentzug gewährleistete. Anschließend erfolgte unter Rotlicht der Wechsel in Objektträgerkästen (ebenfalls mit Zugabe von Silikakapseln) und lichtdichtes Verpacken zur Exposition von 10-40 Tagen bei 4°C. Diese optimale Expositionsdauer der jeweiligen Sonde wurde zuvor durch eine Testreihe mit unterschiedlichen Expositionszeiten ermittelt. Die Entwicklung der Objektträger erfolgte unter Rotlicht für 4min in 16-18°C kaltem Entwickler (Tetenal), anschließend das Abstoppen durch kurzes Eintauchen in Wasser. Es folgte 10min Fixierer (Tetenal) und ausreichendes Wässern über Nacht. Nach Entfernen der Fotoemulsionsschicht auf der Rückseite der Objektträger erfolgte zur Kontrastierung der Sondensignale eine Kresylviolettfärbung (siehe 2.2.3.2) der Gewebe.

2.7.5.3 Immunologische Detektion der DIG-Signale durch Chromogenreaktion

Nach der Posthybridisierung wurden die Objektträger nach ausreichendem Waschen in aq.bidest an der Luft getrocknet und die Schnitte einzeln oder in Gruppen mit PapPen umrundet. Zum Abblocken unspezifischer Bindungen wurden die Schnitte mit ausreichend Blockpuffer (BP) bedeckt und 30-60min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach gründlichem Abspülen des Blockpuffers mit DIG-Detektionspuffer 1 (P1) erfolgte das Auftropfen der Antikörperlösung (1:500 DIG-AK in P1 mit 0,1%BP). Die Schnitte wurden über Nacht bei 4°C und anschließend 2h bei 37°C inkubiert. Zum Entfernen ungebundener Antikörper erfolgte gründliches Waschen der Schnitte in P1 (mind. 2x10min) und anschließend für 15min eine Äquilibrierung der Gewebe in DIG-Detektionspuffer 2 (P2). Dann wurden die Schnitte mit 100-200µl Chromogenlösung (45µl NTB + 35µl BCIP in 10ml P2) betropft und anschließend unter Lichtausschluss inkubiert. Das Fortschreiten der Farbreaktion wurde in Abständen von ca. 2h unter dem Lichtmikroskop begutachtet und bei ausreichender Signalstärke in aq.bidest abgestoppt. Zum Entfernen überschüssiger Chromogenlösung und den Salzen aus P2 wurden

die Schnitte unter mehrfachem Wasserwechsel mindestens einen Tag in aq.bidest gespült und abschließend in Glyceringelatine eingedeckelt. Eine histologische Gegenfärbung ist nicht nötig, da die Chromogenreaktion ausreichend Hintergrundfärbung hinterlässt, um sich auf dem Gewebe zu orientieren.

2.7.6 Kombination zweier unterschiedlich markierter Ribosonden

Zum Vergleich der Expressionsprofile zweier mRNAs bzw. Markierung eines bestimmten Zelltyps durch spezifische mRNA wurden eine radioaktiv- und eine DIG-markierte Ribosonde synthetisiert (siehe 2.7.3.1 und 2.7.3.2), wobei die entsprechende Menge DIG-Sonde zur Konzentrationseinstellung in der bereits eingestellt aus dem Syntheseprozess kommenden Radioaktivsonden-Lösung verdünnt wurde. Der nun beide Ribosonden enthaltende Hybridisierungsmix wurde auf die prähybridisierten Schnitte aufgetragen und über Nacht bei 60°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Posthybridisierung ohne Entwässerung (siehe 2.7.4.3) und die Detektion der DIG-markierten Sonde (siehe 2.7.5.3) Nach ausreichendem Waschen und Trocknen erfolgte die Überprüfung einer erfolgreichen Hybridisierung der Radioaktivsonde mittels eines Röntgenfilm-Autoradiogramms. Anschließend erfolgte das Erstellen eines Gewebeautoradiogramms durch Beschichtung der Objektträger mit Fotoemulsion K5 (Ilford), die bei 42°C im Wasserbad verflüssigt und anschließend mit Reinstwasser 1:2 verdünnt wurde. Das folgende Vorgehen entspricht dem Protokoll zum Erstellen eines Gewebeautoradiogramms (siehe 2.7.5.2) mit Ausnahme der Kresylviolett-färbung, da die DIG-Farbreaktion ausreichend Hintergrundfärbung in dem Gewebe hinterlässt.

2.7.7 Qualitative Auswertung der *in situ*-Hybridisierungen:

Die *in situ*-Hybridisierungen wurden am Lichtmikroskop AX 70 (Olympus) ausgewertet. Zur qualitativen Darstellung der unterschiedlichen Signale wurden dabei Bildausschnitte von Interesse mittels der SPOT RT Slider-Kamera und der dazugehörigen Software SPOT Image Analyser (Version 3.4) in unterschiedlichen Vergrößerungen (4-40x) aufgenommen und mit einem automatisch kalibrierten Längenstandard versehen. Die Auswertung der DIG-Färbungen wurde dabei ausschließlich im Hellfeld vorgenommen, während die Signale der Radioaktivsonde in Hell- und Dunkelfeld dargestellt werden können. Dabei ist zu beachten, dass im Dunkelfeld die Körnung der Fotoemulsion als weiß leuchtende Signale deutlich zu erkennen ist, während das darunterliegende Gewebe einheitlich dunkel erscheint. Im Hellfeld hingegen werden sowohl die Signale der DIG-Sonden bzw. die mit Kresylviolett angefärbten

Zellkerne sichtbar, über denen die Körnung der Fotoemulsion in weniger deutlichem Schwarz erscheint.

2.7.8 Kombination der *in situ*-Hybridisierung mit einer Immunhistochemie

Um gleichzeitig eine mRNA und ein Protein auf demselben Gewebeschnitt darzustellen, lässt sich die *in situ*-Hybridisierung mit einer Immunhistochemie kombinieren. Dabei lassen sich sämtliche hier verwendeten Detektionsmethoden, d.h. DIG- und Radioaktivmarkierung der ISH sowie Peroxidasefärbungen und Doppelfluoreszenzen miteinander kombinieren, es ist maximal also eine Detektion von zwei mRNAs und zwei Proteinen auf demselben Gewebeschnitt möglich. Durchgeführt werden kann diese Technik jedoch nur auf Kryogewebe, da die Einbettung in Paraffin bzw. die aufwändige und lang andauernde Alkoholwaschung der Gewebe nach der Fixierung zum massiven Verlust an RNA führt. In diesem Fall war außerdem zu beachten, dass das zur Verfügung stehende *Laser-Scanning*-Mikroskop keine Möglichkeit zu Digitalisierung von Hellfeld- oder Dunkelfeldaufnahmen besaß und das AX-70 zwar über eine Quecksilberdampflampe zur Fluoreszenzbetrachtung, nicht aber einen Laser zur Anregung des Alexa647-Fluorochroms mit infrarotem Absorptionsmaximum verfügt. Entsprechend wurde in diesem Fall für Doppelfluoreszenzen neben dem grünen Alexa488 mit dem Fluorochrom Cy3 (Indocarbocyanin, siehe Tabelle) mit einem Absorptionsmaximum von 553nm und einer Emission von 575nm (orange) gearbeitet.

2.7.8.1 Integration und Veränderung der IHC- und ISH-Protokolle

Die Vorgehensweise für die Kombination beider Techniken war wie folgt: zunächst erfolgte die *in situ*-Hybridisierung der Schnitte mit den Ribosonden, nach der Posthybridisierung (siehe 2.7.4.3) die Immunhistochemie und im Anschluss die Detektion der Ribosonden nach der jeweils erforderlichen Methode. Zu beachten waren dabei jedoch folgende Änderungen: Da ein Kochen der Schnitte bei über 60°C - wie für die Vorbehandlung der Schnitte für die IHC notwendig - die hybridisierten Ribosonden von der Ziel-RNA lösen würde, wurde dieser Schritt in die Prähybridisierung integriert. Nach der PFA-Fixierung (siehe 2.2.1.2) wurden die Schnitte durch mehrmaliges Waschen von PBS in aq.bidest überführt, in Citratpuffer gekocht (siehe 2.6.1) und nach mehrmaligem Waschen in aq.bidest wieder in PBS überführt. Anschließend erfolgte der Rest der Prähybridisierung wie in 2.7.4.1 beschrieben. Nach der Posthybridisierung konnten die Objektträger entweder getrocknet und der Erfolg einer Hybridisierung mit einer radioaktiven Ribosonde mittels Autoradiographiefilm überprüft oder die Gewebe mit PapPen umrundet und direkt in den 5%BSA/PBS-ICC Blockpuffer und damit in

die Durchführung der Immunhistochemie überführt werden. Nach der DAB/Ni-Farbreaktion bzw. der Inkubation mit Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörpern wurden die Schnitte gründlich gewaschen (4x5min aq.bidest) und an der Luft getrocknet. Im Anschluss erfolgte entweder die Detektion einer radioaktiven Sonde durch Überziehen der Gewebe mit Fotoemulsion (siehe 2.7.5.2) oder die Detektion einer DIG-markierten Ribosonde beginnend mit dem Auftropfen der Blockierlösung (siehe 2.7.5.3). Bei einer Ko-Markierung des Gewebeschnitts mit zwei Ribosonden erfolgte zunächst die Immundetektion der DIG-Ribosonde und im Anschluss die Detektion der Radioaktivsonde wie unter 2.7.8 beschrieben.

2.7.8.2 Qualitative Beurteilung der kombinierten Signale

Das AX70 erlaubte den Wechsel zwischen Fluoreszenz, Hellfeld- und Dunkelfeld ohne Bewegen des Objektträgers, so dass die verschiedenen Signale auf demselben Gewebe visualisiert und mit der SPOT Slider Kamera digitalisiert und mit einem Längenstandard versehen werden konnten. Die Darstellung der rotbraunen DIG-Signale sowie der schwarzen Signale der DAB/Ni-Färbungen erfolgte im Hellfeld, die Silberkörnung der Fotoemulsion im Dunkelfeld und die der Fluorochrome unter Zuschaltung der Quersilberdampflampe und der Verwendung entsprechender Filter. Eine automatisierte Überlagerung der Bilder fand nicht statt, konnte im Nachhinein aber mit der Bildbearbeitungssoftware PhotoShop (Adobe) erstellt werden.

2.8 Puffer und Lösungen

Im Folgenden findet sich die Auflistung aller Puffer und Lösungen, deren Zusammensetzung in der vorangegangenen Methodenbeschreibung nicht aufgeführt wurde. Die Ordnung erfolgt nach Zugehörigkeit zu einer bestimmten Methode und nach der Reihenfolge des Gebrauchs innerhalb dieser Methode. Herstellerangaben zu den verwendeten Chemikalien finden sich unter (2.9).

Mehrfach verwendete Lösungen	PBS (<i>phosphate buffered saline</i>) 50mM:	6,5mM Na ₂ HPO ₄ 1,5mM KH ₂ PO ₄ 2,5mM KCl 140mM NaCl pH 7,25
Gewebeeinbettung/Fixierung	Bouin Hollande (BH) Stammlösung:	0,04M Kupfer-II Acetat 4% (w/v) Pikrinsäure 60% (v/v) H ₂ O
	Bouin Hollande Gebrauchslösung:	100 Teile BH-Stammlösung 10 Teile 37% Formaldehyd 1 Teil Eisessig (CH ₃ COO')
	PFA-Lösung	4% (w/v) PFA in PBS (pH 7,2 – 7,4)
Histologische Gewebefärbung:	Kresylviolett-Färbelösung:	5g Kresylviolett in 600ml H ₂ O 60µl 1M NaAc (NaCH ₃ COO) 340µl 1M Essigsäure <i>Im Dunklen 7 Tage rühren, anschließend filtrieren</i>
	Giemsa-Färbelösung:	20ml Giemsa-Stammlösung in 180ml H ₂ O <i>filtrieren</i>
Immunhistochemie	PBS-ICC	9,5mM NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O 40,5mM NaHPO ₄ x H ₂ O 153mM NaCl pH = 7,45
	Natrium-Citrat-Puffer pH 6.0	54ml 0,1M Zitronensäure (C ₆ H ₈ O ₇) 246ml 0,1M Natriumcitrat: 2700ml aqua dest.
Bakterienkultur:	LB-Medium	1% Trypton (10g/l) 0,5% Bacto Hefe Extrakt (5g/l) 10% NaCl (10g/l) H ₂ O ad 1l pH 7,4, <i>autoklaviert</i> Selektionszusatz 50µg/ml Ampicillin
	LB-Agar	15g Bacto-Agar / 1l LB-Medium <i>autoklaviert</i> Selektionszusatz: 50µg/ml Ampicillin 1mM IPTG 40µl/ml X-Gal 60°C <i>warmen = flüssigen LB-Agar steril in Petrischalen füllen (boden- deckend 2-3mm), 2-3h bei 37°C trocknen, kühl lagern</i>
	SOC-Medium	2% Bactotryptane 0,5% Bacto Hefe Extrakt 10mM NaCl H ₂ O ad 950ml, pH 7,0,

		<i>autoklaviert, kühl lagern vor Gebrauch hinzugeben:</i> 2,5mM KCl 10mM MgCl ₂ 10mM MgSO ₄ x 7H ₂ O 20mM Glucose
	TFB1 – Puffer	30 mM Kaliumacetat 10 mM Calciumchlorid 50 mM Manganchlorid 100 mM Rubidiumchlorid 15 % Glycerin pH- Wert 5,8
	TFB2 – Puffer	10 mM MOPS 75 mM Calciumchlorid 10 mM Rubidiumchlorid 15 % Glycerin pH 6,5, <i>steril filtrieren. Lagerung max. 2 Wochen bei 4 °C</i>
Nukleinsäure-Extraktion:	Lysis-Puffer	1M Tris-Base 0,5M EDTA 10% SDS 2M NaCl 20µg/ml Proteinkinase K (<i>frisch!</i>)
	GTE (Glucose-Tris-EDTA)	50mM Glucose 25mM Tris pH 8,0 10mM EDTA
	NaOH/SDS	0,2N NaOH, 1% SDS (<i>Sodium-Dodecyl-Sulfat</i>)
	KAc (Kaliumacetat)	3M KAc in H ₂ O, pH 4.8
	TES (Tris-EDTA-Natrium)	50mM Tris pH 8,0 10mM EDTA 150mM NaCl
	CPI-Reagenz	50% Phenol 49% Chloroform 1% Isoamylalkohol
	TE (Tris-EDTA)	10mM Tris-Base 1mM EDTA pH 8,0
Agarose-Gelelektrophorese	TAE (Tris-Acetate-EDTA)	40mM Tris-Base 2mM EDTA
	Ladepuffer	30% Glycerol 0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylene Cyanol
In-Situ-Hybridisierung	Hybridisierungs-Puffer	10mM Tris-HCl pH 7,7 0,05% (w/v) t-RNA 1x Denhardt-Lösung 100mg/ml Sonicated Salmon Sperm DNA 1mM EDTA (di-Natriumsalz) 50% (v/v) Formamid 600mM NaCl 10% (w/v) Dextransulfat
	RNase-Puffer	10mM Tris-HCl pH 8,0 500mM NaCl 1mM EDTA 40µg/ml RNase A 2000U RNase1
	SSC (Stocklösung 20x)	3mM NaCl 1,6 M Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ x 2H ₂ O Konz. HCl ad pH 6,3

	TEA-Lösung	6,65ml TEA (Triethanolamin) 493ml H ₂ O 1,5ml HCl ad pH 8,0
	Triton x 0,4% / PBS	450ml aqua bidest 2ml Triton-X100 50ml 10x PBS
	DIG-Detektionspuffer 1 (P1)	100mM Tris HCl, pH 7,5 150mM NaCl
	DIG-Detektionspuffer 2 (P2)	100mM Tris HCl, pH 9,5 100mM NaCl 50mM MgCl ₂
	10x Blockpuffer	10% (w/v) Blockreagenz in 100mM Maleinsäure 150 mM NaCl NaOH ad pH 7,0
	Blockpuffer (BP)	1 Teil 10x Blockpuffer 9 Teile P1
	Chromogenlösung	45µl 4-Nitroblue-Tetrazol-Chlorid 35µl 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- Phosphat in P2
Zellkultur:	Hank's buffered salt solution	PAA Laboratories GmbH (Cölbe)
	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	PAA Laboratories GmbH (Cölbe)
	RPML 1640	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
	Advanced RPML 1640	Invitrogen GmbH, Darmstadt
	Opti Pro™ SFM	Invitrogen GmbH, Darmstadt
	50x Sorbitol-Lösung	6,84 g Sorbitol, H ₂ O ad 30 ml Lösung steril filtrieren
	FBS (fetales bovines Serum)	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
	Trypsin-Lösung	0,05%/0,02%EDTA/CMF

2.9 Herstellerangaben

2.9.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Alle im Folgenden nicht explizit aufgeführten Chemikalien, Lösungsmittel und Verbrauchsmaterialien wurden von Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen. Die Auflistung erfolgt nach dem Alphabet. Standardglas- und plastikwaren stammen von Menzel-Gläser (Romont, Schweiz), Greiner (Deisenhofen) oder Sarstedt (Nümbrecht), Präzisionspipetten von Gilson (Middleton, USA) oder Eppendorf (Hamburg).

³⁵ S-UTP	Amersham Bioscience (Freiburg)
70µm Sieb	Fisher Scientific Ltd (Loughborough, UK)
Bacto Agar	Difco (Detroit, USA)
Bacto Tryptone	Difco (Detroit, USA)
Bacto Hefe Extract	Difco (Detroit, USA)
Corex Zentrifugenröhrchen	Nunc GmbH & Co KG (Wiesbaden)
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	PeqLab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
DIG Labelling Mix	Roche (Basel, Schweiz)
DNAse I, RNase frei	Roche (Basel, Schweiz)
<i>E. coli</i> Top10	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
<i>E. coli</i> NEB 10-beta	New England Biolabs (Ipswich, USA)
Entwickler Developer d-19	Kodak/Integra BioSciences (Woburn, USA)
Entwickler Roentoroll 25	Tetenal Photowerk GmbH (Norderstedt)
Filterpapier	Schleicher & Schüll
Fixierier Fixer	Kodak/Integra BioSciences (Woburn, USA)
Fixierer Superfix 25	Tetenal Photowerk GmbH (Norderstedt)
Fotoemulsion NTB-2	Kodak/Integra BioSciences (Woburn, USA)
Fotoemulsion K5	Ilford (Marly, Schweiz)
Formamid	BDH (Poole, England)
Fluorsafe (Eindeckelmedium)	Calbiochem (San Diego, USA)
Gene Ruler 100 kb DNA ladder plus	MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Roth)
Gene Ruler 1kb DNA ladder	MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Roth)
IPTG	PeqLab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
KAPA2GFAST Multiplex PCR Kit	Kapa Biosystems Inc (Woburn, USA)
Kulturröhrchen 10ml	BD (Franklin Lakes, USA)
Kryoröhrchen Cyrotubes	Nunc GmbH & Co. KG (Wiesbaden)
Lumasafe (Szintillationsflüssigkeit)	Lumac LSC B.V. (Groningen, Niederlande)
Micro Bio-Spin P30 Columns	BIO-RAD (München)
Neubauer Zählkammer	W. Schreck (Hofheim)
Netzmittel Mirasol2000Antistatic	Tetenal Photowerk GmbH (Norderstedt)
NucleoSpin Extract II	Macherey&Nagel GmbH & Co. KG (Düren)
PapPen	BeckmanCoulter (Marseille, Frankreich)
Paraffin	Vogel Histo-Comp (Gießen)
pGEM®-T Vector System I	Promega GmbH (Mannheim)
pCR-@TOPO2.0	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
Primer, Oligo-dT	Amersham Biosciences Europe GmbH (Freiburg)
Primer, Random Hexamer	Bioron GmbH (Ludwigshafen)
QIAshredder	Qiagen GmbH (Hilden)
Qiagen DNaseI Kit	Qiagen GmbH (Hilden)
RNeasy Plus Mini/Micro Kit	Qiagen GmbH (Hilden)
RedTaq Polymerase	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Restriktionsendonucleasen	NewEngland BioLabs GmbH (Frankfurt)
RevertAid Transkription Kit	MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Roth)
Ribonuclease Inhibitor	MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Roth)
Röntgenfilm Kodak Bio Max MR	Kodak/Integra BioSciences (Woburn, USA)
TissueTek O.T.C. Einbettmedium	Sakura Finetik (Zoeterwoude, Niederlande)
TissueTek Kryoschalen	Sakura Finetik (Zoeterwoude, Niederlande)
TissueTek Gewebekassetten	Sakura Finetik (Zoeterwoude, Niederlande)
TSA Kit	PerkinElmer (Waltham, USA)
Vecastain Blocking-Kit	Vector Laboratoires, Inc. (Burlingame, USA)
Vecastain Elite ABC-Kit	Vector Laboratoires, Inc. (Burlingame, USA)

2.9.2 Geräte

Im Folgenden findet sich eine Auflistung aller benutzten Geräte, eingeteilt in Gruppen verschiedener Funktionsbereiche:

Allgemeines:	Autoklav Bunsenbrenner Fireboy Plus Heizblock HB-130 Magnetrührer MR-80 pH-Meter 766 Pipettierhilfe Pipetboy acu Reinstwasseranlage X-CAD Sterilbank Uniflow 1800 Thermometer (diverse) Thermorührer ETS D4fuzzy Vortex Genie 2 Wasserbad Julabo 5	Fedegari Autoclavi Spa (Albuzzano, Italien) Integra Biosciences GmbH (Fernwald) Unitex GmbH (Seefeld) Heidolph Instruments GmbH (Schwabach) Knick Elektronische Messgeräte (Berlin) Integra Biosciences GmbH (Fernwald) TKA Wasseraufbereitung (Niederelbert) UniEquip Laborgeräte (Planegg) IKA Werke GmbH & Co KG (Staufen) IKA Werke GmbH & Co KG (Staufen) Bender & Hohenheim AG (Zürich, Schweiz) Julabo Labortechnik GmbH (Seelbach)
Gelelektrophorese:	Gelschlitten Pufferkammern Spannungsquellen GelDoc100 Thermodrucker Video Copy Processor	Kodak / Integra Biosciences (Fernwald) Kodak / Integra Biosciences (Fernwald) BIO-RAD (München bzw. Hercules, USA) BIO-RAD (München bzw. Hercules, USA) Mitsubishi Electric (Tokio, Japan)
Inkubatoren & Öfen:	Brutschrank B 5060 EC Hybridisierungsöfen 400 HY-E Inkubationsöfen (16°C/37°C) Inkubationsöfen (37°C, 55°C) Umluftöfen Schüttelinkubator Ceromat H	Heraeus (Hanau) Bachofer (Reutlingen) WTB Binder Labortechnik (Reiskirchen) Heraeus (Hanau) Memmert (Schabach) B.Braun Biotech International (Melsungen)
Mikroskope:	Konfokales LaserScanning BX50WI Mikroskop AX70 Mikroskop BX40 Mikroskop IX70 Laser Capture Axio Observer Z1 SPOT Kamera	Olympus (Hamburg bzw. Tokio, Japan) Olympus (Hamburg bzw. Tokio, Japan) Olympus (Hamburg bzw. Tokio, Japan) Olympus (Hamburg bzw. Tokio, Japan) Karl Zeiss (Jena bzw. München) Diagnostics Instruments inc. (Seoul, Korea)
Mikrotome:	Kryostat CM 3050S Kryostat HM 500 CM Rotationsmikrotom HM 325	Leica Microm Laborgeräte (Walldorf) Leica Microm Laborgeräte (Walldorf) Leica Microm Laborgeräte (Walldorf)
Paraffinierung	TissueTek Paraffin-Einbett-Automat TissueTek Paraffin-Ausbett-Station	Sakura Finetek (Zoeterwoude, Niederlande) Sakura Finetek (Zoeterwoude, Niederlande)
Spektrometer:	Photometer Ultrospec 3000 Nanodrop ND-2000	Amersham Biosciences GmbH (Freiburg) Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Szintillationszähler	Wallac 1410 Hidex	Amersham Biosciences GmbH (Freiburg) Frenzel Consulting
Thermocycler:	Gene Amp PCR System 9700 Peltiert Thermal Cycler PTC-200	Applied Biosystems (Foster City, USA) MJ Research (Watertown, USA)
Waagen:	Analysewaage SBC-33 Präzisionswaage 440-47M	Scaltec Instruments (Denver, USA) Kern & Sohn GmbH (Balingen-Frommern)
Zentrifugen:	Tischzentrifuge Biofuge pico Vakuumbzentrifuge Speedvac Universalzentrifuge Multifuge 3LR Ultrazentrifuge J2-21 Ultrazentrifuge J26XP	Heraeus (Hanau) Heraeus (Hanau) Heraeus (Hanau) Beckmann (München) Beckmann Coulter (Krefeld)

2.9.3 Software

Im Folgenden findet sich eine Liste mit Herstellerangaben der verwendeten Software.

BLAST	NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA)
Endnote X4	Thomson Reuters (NewYork, USA)
Excel	Microsoft (Redmond, USA)
FluoView 2.1	Olympus (Hamburg bzw. Tokyo, Japan)
ImageJ	NIH (National Institute of Health, Bethesda, USA)
MCID Elite TM 7.0	Imaging Reasearch Inc. (St.Catharines, Kanada)
PhotoShop 7.0	Adobe Systems Incorporated (San Jose, USA)
Protein-Accessions	NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA)
Primer 3	Whitehead Institute for Biomedical Research (Cambridge, USA)
Prism 4.0	GraphPad Software (San Diego, USA)
SPOT Image Analysis 3.4.	Diagnostics Instruments inc. (Seoul, Korea)

3 Ergebnisse

In der folgenden Erläuterung finden sich die Ergebnisse quantitativer Analysen nur in graphischer Darstellung. Im Lauftext nicht berichtete Zahlenwerte und Ergebnisse statistischer Analysen finden sich in tabellarischer Auflistung im Anhang (siehe 5.2).

3.1 Calcitonin-gene related peptide

Zur Klärung der Frage, welche Rolle CGRP während der ALS-Pathogenese spielt, wurde zunächst die Auswirkung einer Deletion des α CGRP auf den Krankheitsverlauf des SOD1-Mausmodells untersucht. Anschließend wurden die CGRP-Immunoreaktivität sowie die Expressionsprofile der Rezeptorkomponenten CRLR und RAMP1-3 im Wildtyp und deren Veränderungen im SOD1-Mausmodell charakterisiert. Abschließend erfolgte die Einkreuzung einer Deletion der CGRP-spezifischen Rezeptorkomponente RAMP1 in das SOD1-Mausmodell.

3.1.1 Effekte einer α CGRP-Deletion auf den Krankheitsverlauf der ALS

Da die vorangegangene Diplomarbeit Hinweise auf einen eventuellen neuroprotektiven Einfluss von α CGRP in Motoneuronen ergab (siehe Ringer et al., 2009), sollte im Zuge dieser Arbeit der Effekt der Einkreuzung einer α CGRP-Deletion auf den Krankheitsverlauf SOD1-transgener Mäuse untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden je mindestens 20 Tiere der folgenden Test- und Kontrollgruppen beginnend am postnatalen Tag (P) 49 wöchentlichen Untersuchungen zur Entwicklung des Körpergewichts sowie der motorischen Funktion im PaGE-Test unterzogen: Wildtyp-Kontrollgruppe (WT:WT, n = 23), α CGRP-Knockout-Kontrollgruppe (WT:KO, n = 23), SOD1-transgene Tiere ohne α CGRP-Defizienz (TG:WT, n = 25) sowie die Testgruppe der SOD1-transgenen Tiere mit α CGRP-Defizienz (TG:KO, n = 24).

Unterschiede in der Entwicklung des Körpergewichts (Abb. 3.1.1.1 A) zwischen α CGRP-kompetenten und -defizienten Tieren ohne SOD1-Transgen, oder motorische Defizite im PaGE-Test (Abb. 3.1.1.1 B) waren nicht zu beobachten; im gesunden Tier hatte die α CGRP-Deletion folglich keine Effekte auf die untersuchten Parameter. Sowohl in der Entwicklung des relativen Körpergewichts als auch im PaGE-Test unterschieden sich die Krankheitsverläufe von SOD1-transgenen Tieren mit und ohne α CGRP-Defizienz nicht voneinander. Beide Gruppen zeigten im Fall des Körpergewichts beginnend an P112, im PaGE-Test ab P105

zeitgleich signifikante Unterschiede zum jeweiligen Wildtyp (siehe Pfeile in 3.1.1.1 A und B). Auch in der durchschnittlichen Überlebensrate nach Kaplan-Meyer (Abb. 3.1.1.1 C) zeigte sich bei α CGRP-defizienten Tieren mit 139,5 Tagen keine Veränderung im Vergleich zu α CGRP-kompetenten SOD1-transgenen Tieren mit 138,0 Tagen. Die CGRP-immunoreaktiven Vakuolen (siehe 1.2.4 und 3.1.2) traten ebenfalls noch auf.

Die Deletion von α CGRP hatte folglich keinerlei Effekt auf den Krankheitsverlauf SOD1-transgener Mäuse.

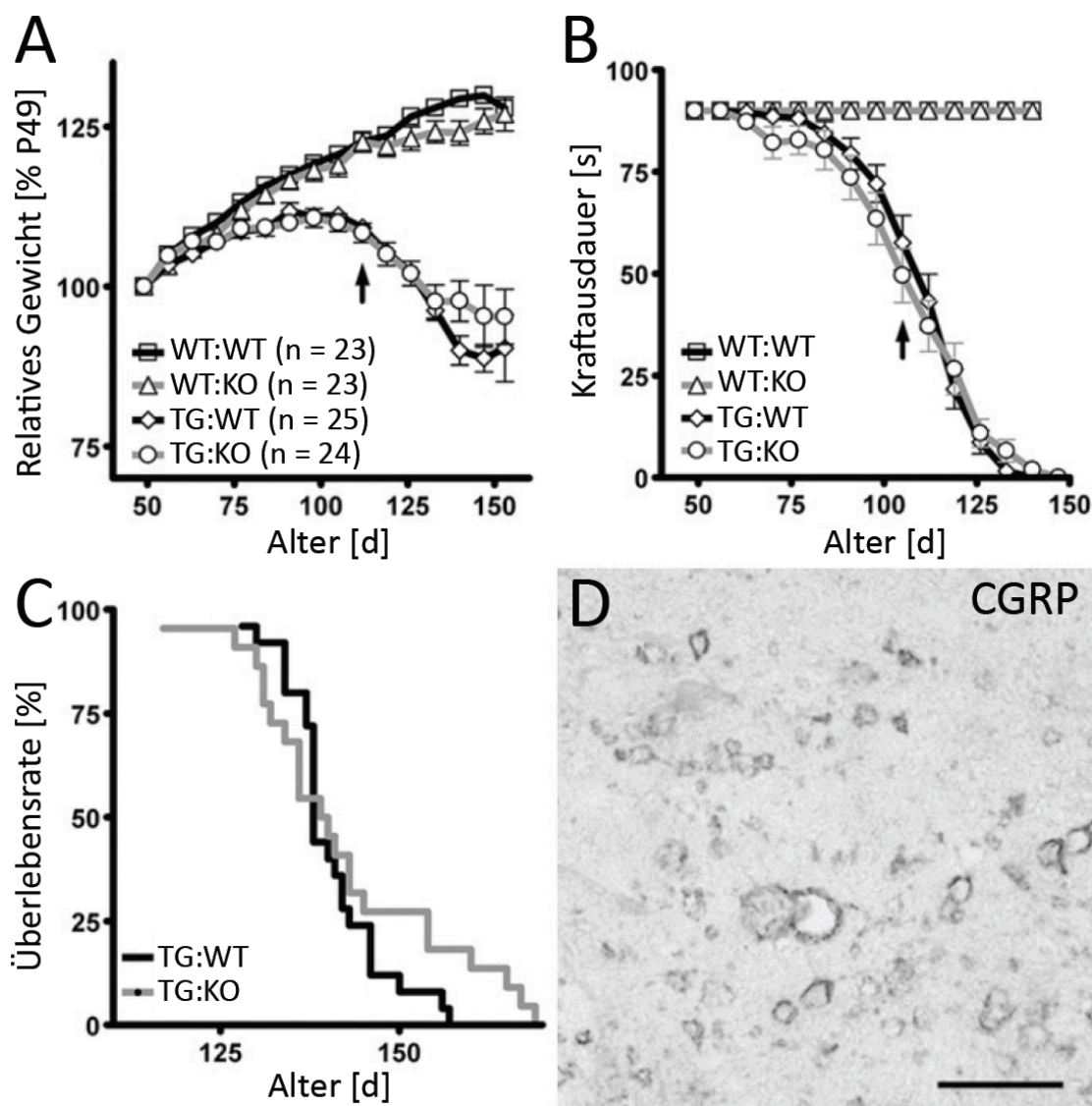


Abb. 3.1.1.1: Effekte einer α CGRP-Deletion auf den Krankheitsverlauf der ALS. (A) Entwicklung des relativen Körpergewichts. **(B)** Zeitverlauf der motorischen Funktionen im PaGE-Test. WT: Wildtyp, KO: α CGRP-defizient, TG: SOD1-transgen. Pfeile indizieren den Zeitpunkt (P112 in A, P105 in B), an dem sich TG:WT und TG:KO signifikant von WT:WT bzw. WT:KO unterscheiden. **(C)** Relatives Überleben nach Kaplan-Meyer. **(D)** CGRP-immunoreaktive Vakuolen im lumbalen Rückenmark eines SOD1-transgenen Tiers mit α CGRP-Deletion (TG:KO) im Endstadium (P130). Balken entspricht 50 μ m.

3.1.2 Zeitverlauf der Veränderung der CGRP-Immunoreaktivität im Gehirn

Um den Zeitverlauf der Entwicklung der CGRP-positiven Vakuolen im Gehirn analog des Vorgehens im Rückenmark (Ringer et al., 2009) zu charakterisieren, wurde in je 4 SOD1-transgenen Tieren der repräsentativen Stadien (P40, P70, P100, P130) und zur Kontrolle je 2 Wildtyptieren gleichen Alters die CGRP-Immunoreaktivität (IR) untersucht. Von jedem somatomotorischen Hirnnervenkern wurde mindestens ein Gewebsschnitt pro Tier gefärbt und qualitativ auf Veränderungen des IR-Musters in den Motoneuronen und dem sie umgebenden Neuropil analysiert. Im Anschluss erfolgte die Betrachtung anderer, in den jeweiligen sagittalen Schnittebenen lokalisierten Areale mit höheren motorischen Funktionen (z.B. Striatum und Motorkortex) als auch verschiedener nicht-motorischer Areale.

3.1.2.1 CGRP-Immunoreaktivität in somatomotorischen Arealen des Hirnstamms

In Abb. 3.1.2.1 ist die CGRP-IR im Ncl. oculomotorius/trochlearis (III/IV), dem Ncl. facialis (VII), dem Ncl. ambiguus (Xa) sowie im Neuropil im Wildtyp (A-D) und den verschiedenen Stadien SOD1-transgener Mäuse (E-T) dargestellt.

Die Somata der Motoneurone aller Hirnnervkerne zeigten im Wildtyp (A-C) eine starke, retikuläre CGRP-IR. In den das Neuropil durchziehenden Neuriten fand sich eine granuläre Immunoreaktivität (D). Dieses Muster blieb über alle untersuchten Alterstadien hinweg unverändert. In SOD1-Tieren fand sich in der CGRP-IR der Somata an P40 (E-G) und P70 (I-K) kein Unterschied zum Wildtyp, doch traten im Neuropil bereits an P40 (H) kleine Vakuolen mit 1-2 μm Durchmesser in den Neuriten auf, die an P70 (L) zu einem Durchmesser von circa 5 μm angeschwollen waren. An P100 waren die Vakuolen auf 7-10 μm Durchmesser angewachsen (P), an P130 maßen sie bis zu 20 μm und waren deutlich auf den Übersichten der Kernareale (M-S) zu sehen. Besonders stark ausgeprägt war diese Vakuolisierung im Ncl. facialis (N, R) und Ncl. ambiguus (O, S), während im Kernkomplex des Ncl. oculomotorius/trochlearis auch in späten Stadien (M, Q) nur sehr wenige Vakuolen zu beobachten waren. Auch in diesem als ALS-resistent geltenden Kernareal war eine Abnahme der CGRP-positiven Motoneurone zu beobachten (vergleiche A, E mit M, Q), wobei diese nicht so drastisch ausfiel wie z.B. im Ncl. facialis (B), wo im Endstadium (P130) kaum noch CGRP-positive Motoneurone zu finden waren (R) oder dem Ncl. ambiguus, wo die auf den ersten Blick recht zahlreich verbleibenden Neurone im Endstadium (S) im Vergleich zum Wildtyp (C) oder P40 (G) fast ausnahmslos Deformationen aufwiesen und sich vermutlich in der Degeneration befanden.

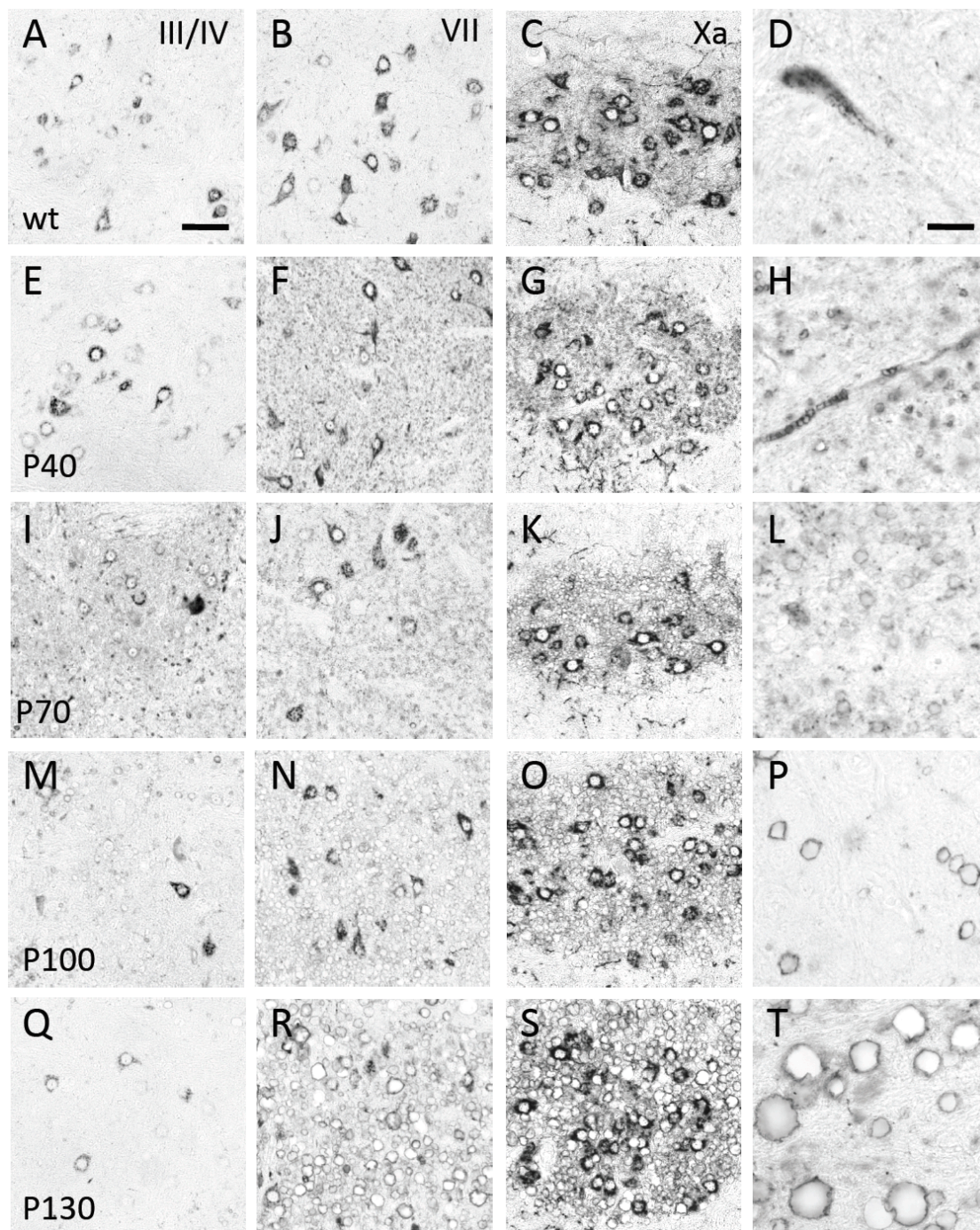


Abb. 3.1.2.1 Zeitverlauf der CGRP-IR in somatomotorischen Arealen des Hirnstamms. III/IV: Nucleus (Ncl.) oculomotorius/trochlearis, VII: Ncl. facialis, Xa: Ncl. ambiguus. Im Wildtyp (wt, A-D) zeigte sich CGRP-Immunoreaktivität (IR) in retikulären Strukturen in den Somata der Motoneurone sowie in granulärer Form in den abgehenden Neuriten (D). Beginnend am postnatalen Tag (P) 40 (E-H) traten in SOD1-transgenen Tieren in den Neuriten Vakuolen mit einem Durchmesser von 1-2 μm auf, die in den folgenden Stadien (P70: I-L, P100: M-P) an Volumen zunahm und im Endstadium (P130, Q-T) bis zu 20 μm maßen (siehe Hochvergrößerung H,L,P,T). Während in dem als ALS-resistent geltenden Kernkomplex III/IV nur wenige Vakuolen auftraten und die Motoneurone auch in späten Stadien eine gesunde Morphologie zeigten (E, I, M, Q), traten in den ALS-vulnerablen Kernen VII und Xa wesentlich mehr Vakuolen auf (N,O,R,S) und die Anzahl verbleibender Motoneurone war entweder bereits stark reduziert (z.B. Ncl. VII, R) oder die Somata zeigten starke Deformationen, die auf eine fortgeschrittene Degeneration der Motoneuronen hindeuten (z.B. Ncl. Xa, S). Balken in A entspricht 50 μm und gilt auch für B, C, E-H, I-K, M-O, Q-S; Balken in D entspricht 20 μm und gilt auch für H, L, P, T.

Es ist also festzuhalten, dass die Vakuolisierung bzw. die Veränderung der CGRP-IR in den Arealen sekundärer Motoneurone im Hirnstamm an P40 und damit zum selben Zeitpunkt wie im lumbalen Rückenmark (siehe Ringer et al., 2009) auftritt und diese histopathologischen Phänomene deutlich vor dem Auftreten klinischer Symptome an P80-100 beginnen.

Eine Ko-Markierung von CGRP mit dem Dendritenmarker MAP2 bzw. dem axonalen Marker NF200 bestätigte analog zu den Ergebnissen im Rückenmark die Lokalisation der CGRP-Vakuolen in Neuriten an P40 (nicht gezeigt). In späteren Stadien zeigte sich keine Ko-Lokalisation der Neuritenmarker mit den CGRP-Vakuolen mehr, die nun losgelöst von einer klaren Zuordnung zu einem Zellkompartiment frei im Neuropil vorlagen.

Parallel zu der Rückenmarksstudie konnte bei einer Ko-Markierung von CGRP auch in den somatomotorischen Nuclei im Gehirn eine enge räumliche und zeitliche Assoziation der CGRP-IR mit der ab P60 einsetzenden Astrozytenaktivierung beobachtet werden (nicht gezeigt).

3.1.2.2 CGRP-Immunoreaktivität in nicht-somatomotorischen Arealen

Durch die Verwendung von Sagittalschnitten konnte neben den somatomotorischen Kerngebieten auch ein Großteil anderer Gehirnregionen verschiedenster Funktion untersucht werden. Ein Hauptaugenmerk sollte dabei auf anderen an der Motorik beteiligten Arealen wie Motorkortex, Striatum und Ncl. accumbens liegen, doch wurden CGRP-positive Vakuolen in nahezu allen Bereichen des Gehirns gefunden. Im Gegensatz zu den somatomotorischen Nuclei lokalisierten in den ebenfalls von der Vakuolisierung betroffenen Gehirnarealen die Vakuolen ausschließlich im Neuropil; eine Vakuolisierung der Somata wie bei den Motoneuronen (siehe Ringer et al., 2009) war nicht zu beobachten. Obwohl auch hier die ersten Vakuolen an P40 zu beobachten waren, traten große Unterschiede bezüglich der Anzahl und der im Endstadium erreichten Größe der Vakuolen sowie im Ausmaß der begleitenden Astrozytenaktivierung auf (siehe Abb. 3.1.2.2). Selbst im Endstadium fanden sich im Motorkortex (A) und dem Striatum (B) nur vereinzelte und relativ kleine CGRP-positive Vakuolen von maximal 5 μm Durchmesser, während im Ncl. accumbens (C) wesentlich größere Vakuolen mit bis zu 20 μm Durchmesser auftraten. Eine große Zahl mittelgroßer Vakuolen (5-10 μm) fanden sich auch im Hypothalamus (D), dem Bulbus olfactorius (E) und dem Ncl. anterodorsalis des Thalamus (F), außerdem in der Substantia nigra (G) und dem Locus coeruleus (J), die mit bis zu 20 μm Durchmesser die größten und zahlreichsten Vakuolen aufwiesen. Ebenfalls von einer starken Vakuolisierung betroffen waren das periaquäduktale Grau (H), der Ncl. ruber (I) sowie die inferiore Olive (K), wobei letzter mit 0,5-1 μm Durchmesser die kleinsten im Endstadium zu findenden Vakuolen zeigte.

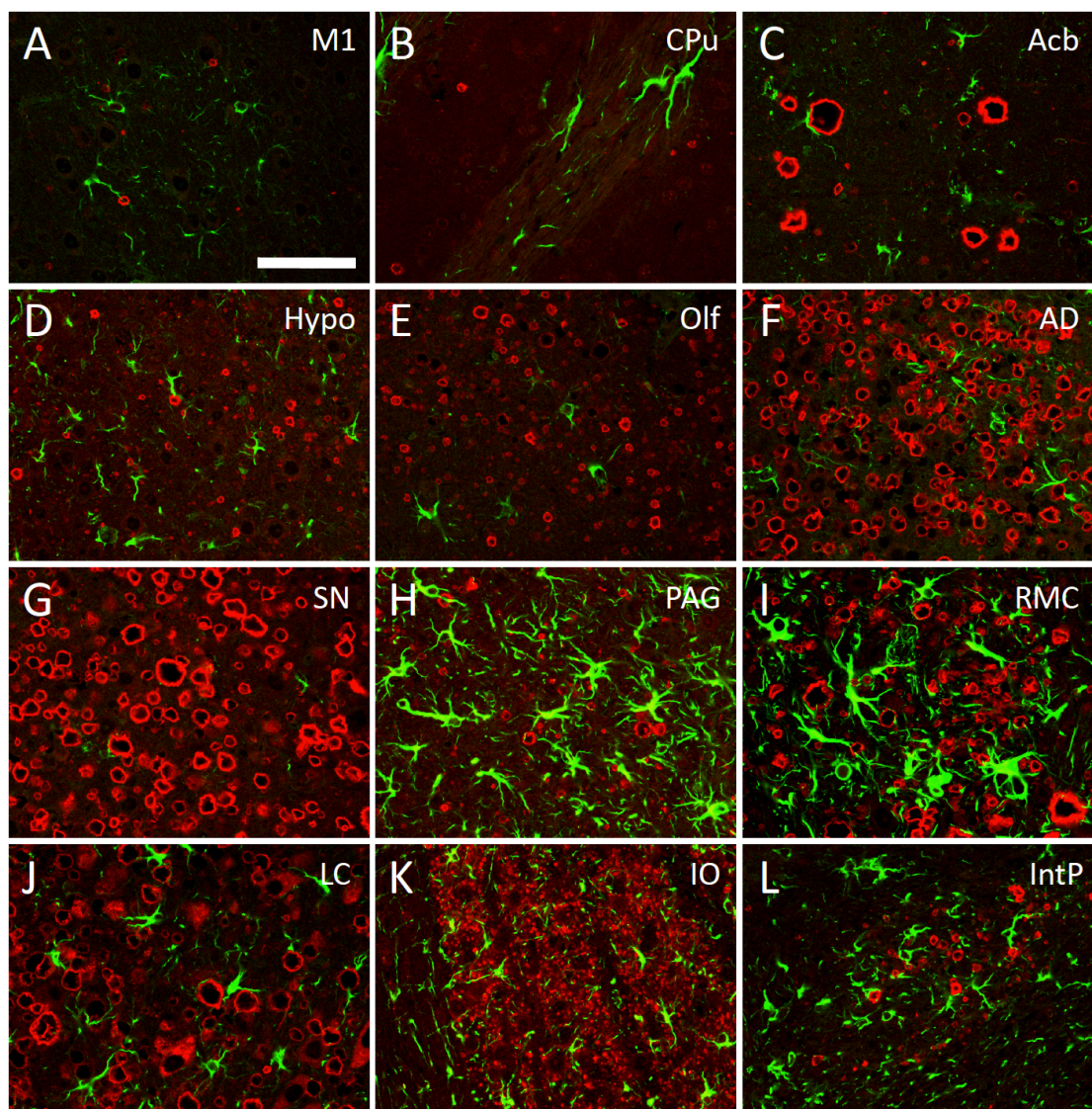


Abb. 3.1.2.2 CGRP-IR und Astrozytenaktivierung in nicht-somatomotorischen Arealen des Gehirns. Doppel-fluoreszenzfärbung von CGRP (rot) und dem Astrozytenmarker GFAP (grün) im Endstadium SOD1-transgener Mäuse. (A) primärer Motorkortex. (B) Striatum. (C) Nucleus (Ncl.) accumbens (D) Hypothalamus (E) Bulbus olfactorius (F) Ncl. anteriodorsalis des Thalamus (G) Substantia nigra (H) periaquäduktale Grau (I) Ncl. ruber, pars magnocellularis (J) Locus coeruleus (K) Inferiore Olive (L) Ncl. interpositus. Balken in (A) entspricht 50 µm und gilt für B-L.

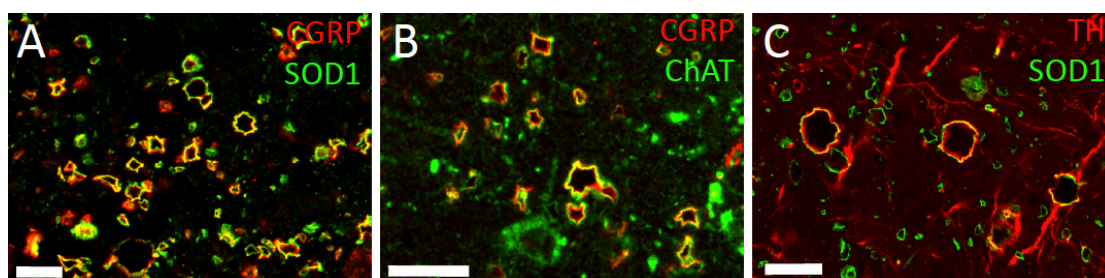


Abb. 3.1.2.3 Koreaktivität der Vakuolen mit CGRP, SOD1, ChAT und TH. Doppelfluoreszenzfärbungen im Endstadium SOD1-transgener Mäuse von (A) CGRP (rot) und Superoxiddismutase 1 (SOD1, grün) im Hypothalamus (B) CGRP (rot) und Cholinacetyltransferase (grün) im Nucleus accumbens sowie (C) Tyrosinhydroxylase (TH, rot) und SOD1 (grün) im Locus coeruleus. Balken in A, B und C entspricht jeweils 20 µm.

Selbst im Ncl. interpositus des Kleinhirns (L) trat eine Vakuolisierung auf, begleitet von einer Astrozytenaktivierung, die sich im Endstadium bis weit in die weiße Substanz der Kleinhirnwindungen hineinzog.

Eine direkte Korrelation zwischen Ausmaß der Vakuolisierung und der Stärke der Astrozytenaktivierung ließ sich nicht feststellen, da einige Areale mit starker Vakuolisierung kaum Astrozytenaktivierung zeigten (z.B. Substantia nigra, Abb. 3.1.2.2 G), während andere Areale trotz schwacher Vakuolisierung eine starke Astrozytenaktivierung aufwiesen (z.B. das periaquäduktale Grau, Abb. 3.1.2.2 H). Die einzigen sowohl von der Vakuolisierung als auch der Astrozytenaktivierung ausgesparten Gehirnareale waren der Thalamus (mit Ausnahme des Ncl. anterodorsalis) sowie der Kleinhirnkortex.

Eine Doppelfärbung von CGRP mit der Cholinacetyltransferase (ChAT, Markerprotein für cholinerge Neurone) bzw. SOD1 (Abb. 3.1.2.3) ergab, dass die CGRP-positiven Vakuolen auch in nicht-motorischen Gehirnarealen mit ChAT (A) und SOD1 (B) kolokalisierten. Außerdem fanden sich in der Substantia nigra und dem Locus coeruleus (C) Kolokalisationen der SOD1-positiven Vakuolen mit Tyrosinhydroxylase (TH), einem Marker für dopaminerge und noradrenerge Neurone. Bei allen anderen getesteten Identifikationsmarkern (VGlut für glutamaterge Neurone, VIAAT für inhibitorische Neurone) und Neuropeptiden (PACAP, VIP, Substanz P, Neuropeptid Y) wurde keine Immunoreaktivität in den Vakuolen festgestellt.

Ein einheitliches Kriterium für die Entstehung einer solchen Vakuolisierung in bestimmten Arealen bzw. Neuronentypen konnte nicht gefunden werden. So zeigten z.B. andere dopaminerge bzw. adrenerge Neurone im Hypothalamus (z.B. Nucleus arcuatus) und der ventralen Medulla oblongata (z.B. Raphekerne) keine Vakuolisierung, ebenso wenig wie CGRP-exprimierende Neurone im Thalamus (z.B. Ncl. ventromedialis) oder in den Hinterwurzelganglien. Außerdem beschränkte sich die Vakuolisierung in allen nicht-motorischen Arealen auf Nervenfasern, eine Vakuolisierung der Somata wie in den Motoneuronen beobachtet (Ringer et al., 2009) konnte nicht gefunden werden.

Es ist also zusammen zu fassen, dass i) längst nicht nur Motoneurone von den histopathologischen Veränderungen im Verlauf der SOD1-induzierten ALS betroffen sind, ii) die Vakuolisierung in nicht-motorischen ebenfalls schon mit P40 beginnt und iii) diese Areale zumindest in diesem Mausmodell eine deutlich stärkere pathologische Veränderungen zeigen als die primären Motoneurone im Kortex oder das ebenfalls in die Motorik involvierte Striatum.

3.1.3 CGRP-Expression als Unterscheidungskriterium für vulnerable und resistente Motoneurone

Bei der Doppelfluoreszenzfärbung mit CGRP und dem Motoneuronenmarker ChAT (siehe oben) fiel auf, dass i) nicht alle somatomotorischen Neurone CGRP exprimierten, ii) vor allem die als ALS-resistent geltenden Nuclei oculomotorius (III), trochlearis (IV) und abducens (VI) wesentlich weniger CGRP-exprimierende Motoneuronen enthielten als ALS-vulnerable Kerne wie z.B. der Nucleus facialis (VII), ambiguus (Xa) oder hypoglossus (XII) und iii) in den vulnerablen Kernen der Anteil an Motoneuronen mit CGRP-Expression im Verlauf der ALS-Erkrankung in SOD1-transgenen Tieren stetig abzunehmen schien. Ein Blick in die Literatur bestätigte, dass auch im Menschen nicht alle Motoneurone CGRP-exprimieren und die Kernkomplexe zur Innervation der äußeren Augenmuskulatur ebenfalls von der ALS-Pathologie ausgespart bleiben. Außerdem sind im Endstadium der Erkrankung im Rückenmark von ALS-Patienten keine CGRP-exprimierenden Motoneuronen mehr zu finden, was zu der Frage führte, ob sich ALS-vulnerable und ALS-resistente Motoneurone durch ihr CGRP-Expressionsmuster unterscheiden lassen.

3.1.3.1 Definition drei verschiedener Motoneuronen-Typen anhand ihrer CGRP-Expression

Durch Doppelfluoreszenz-Markierung des Motoneuronenmarkers ChAT mit CGRP konnten im Wildtyp anhand der CGRP-Immunreaktivität (IR) drei verschiedene Motoneuronen-Typen definiert werden (Abb. 3.1.3.1 A und B). Wie hier am Beispiel des Ncl. facialis gezeigt, fanden sich ChAT-markierte Motoneurone i) ohne CGRP-IR ($\#$, *nonCGRP*), ii) mit einer leichten, diffus im Zytoplasma lokalisierten CGRP-IR ($*$, *lowCGRP*) sowie iii) mit starker, perinuklär-retikulärer CGRP-IR ($+$, *highCGRP*), die auf eine Lokalisation im Endoplasmatischen Retikulum schließen ließ. Die Verteilung der Motoneuronentypen innerhalb eines Nucleus erschien dabei zufällig, eine Unterteilung in verschiedene, einen bestimmten Motoneuronentyp enthaltende Subnuclei lag nicht vor.

3.1.3.2 Gruppierung der motorischen Nuclei anhand des relativen Gehalts verschiedener Motoneuronentypen

Bei einer umfassenden Analyse aller somatomotorischen Neurone im Hirnstamm und lumbalen Rückenmark mittels der ChAT/CGRP-Doppelimmunfluoreszenz zeigte sich eine unterschiedliche Verteilung der Motoneuronentypen, auf dessen Basis sich die Hirnnervenkerne in drei Gruppen unterteilen ließen (Abb. 3.1.3.2. C). Die folgenden Daten entstammen aus je 3

Wildtyp-Tieren mittleren Alters (P90-120) und 10 Werten pro Nucleus pro Tier, die hier nicht genannten Absolutwerte finden sich in Tabelle 3.1.3.1. (siehe unten). In der Neuronenpopulation des Ncl. oculomotorius (III) und Ncl. trochlearis (IV) überwogen *nonCGRP*-Neurone mit $78,1 \pm 7,2\%$, $20,3 \pm 7,5\%$ waren *lowCGRP*-Neurone und $1,1 \pm 1,3\%$ *highCGRP*-Neurone. Eine ähnliche Verteilung fand sich im Ncl. abducens (VI) mit $94,6 \pm 7,8\%$ *nonCGRP*- , $4,7 \pm 6,8\%$ *lowCGRP*- und $0,7 \pm 2,1\%$ *highCGRP*-Neuronen. Aufgrund der vergleichbaren Zusammensetzung mit einem deutlich dominierenden Anteil an *nonCGRP*-Neuronen wurden die Ncl. III, IV und VI als die erste, *oculomotorische Gruppe* zusammengefasst.

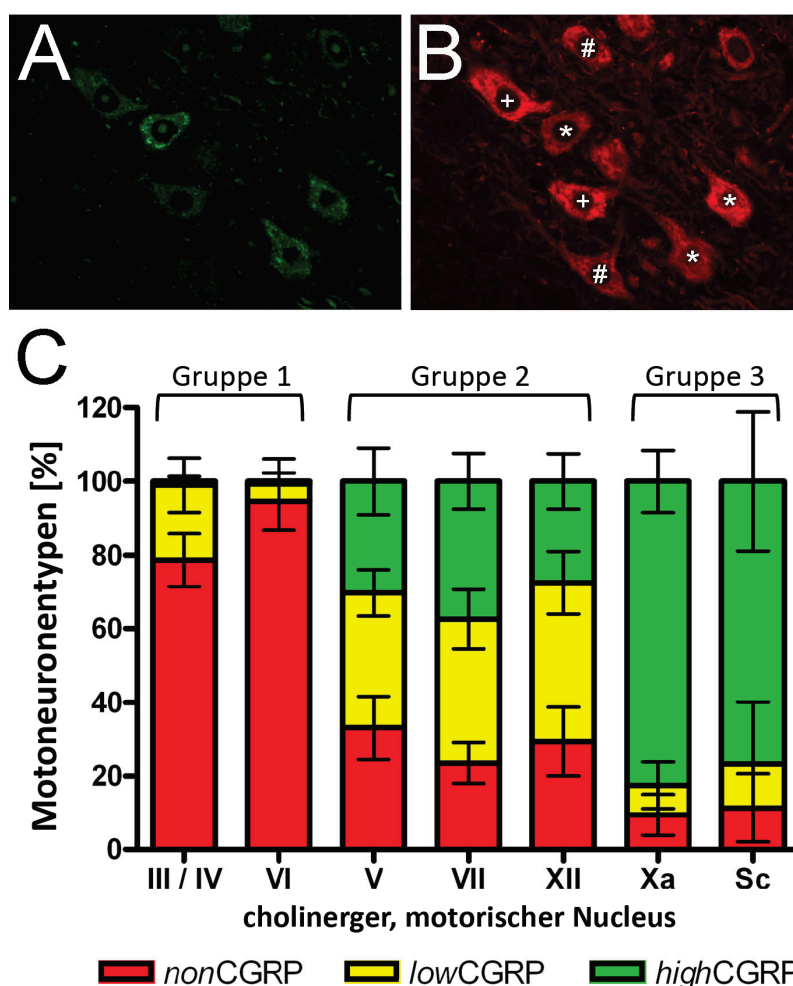


Abb. 3.1.3.1. Definition von Motoneuronen-Typen und Gruppen motorischer Nuclei anhand der CGRP-Expression. Gezeigt ist (A) die CGRP-Expression von (B) ChAT-markierten Motoneuronen im Nucleus (Ncl.) facialis zur Definition von *highCGRP*-Motoneuronen (*) mit starker, retikulärer CGRP-Immunoreaktivität (IR), *lowCGRP*-Motoneuronen (+) mit schwacher, zytoplasmatischer CGRP-IR und *nonCGRP*-Motoneuronen (#) ohne CGRP-IR. (C) Verteilung der Motoneuronentypen innerhalb der einzelnen somatomotorischen Nuclei. III/IV: Ncl. oculomotorius/trochlearis, VI: Ncl. abducens, V: Ncl. motorius n. trigemini, VII: Ncl. facialis, XII: Ncl. hypoglossus, Xa: Ncl. ambiguus, Sc: lumbales Rückenmark (*spinal cord*).

Im Ncl. motorius n. trigemini (V), Ncl. facialis (VII) und Ncl. hypoglossus (XII) zeigte sich eine ungefähr ausgeglichene Anzahl an Motoneuronen aller drei Typen, so dass diese Kerne zur zweiten, *facialen Gruppe* zusammengefasst wurden. Im Einzelnen enthielt der Ncl. motorius n. trigemini $33,1 \pm 8,6\%$ *nonCGRP*-, $36,6 \pm 6,4\%$ *lowCGRP*- und $30,3 \pm 9,1\%$ *highCGRP*-Neurone; der Ncl. facialis $23,5 \pm 5,5\%$ *nonCGRP*-, $39,1 \pm 8,1\%$ *lowCGRP*- und $37,4 \pm 7,6\%$ *highCGRP*-Neurone; und der Ncl. hypoglossus $29,4 \pm 9,3\%$ *nonCGRP*-, $43,1 \pm 8,5\%$ *lowCGRP*- und $27,5 \pm 7,5\%$ *highCGRP*-Neurone.

In der dritten und letzten Gruppe, bestehend aus dem Ncl. ambiguus n. vagi (Xa) und der lateralen Motoneuronensäule des lumbalen Rückenmarks (Sc, *spinal cord*), dementsprechend *spinomedulläre Gruppe* genannt, dominierten *highCGRP*-Motoneurone. So enthielt der Ncl. ambiguus n. vagi nur $9,5 \pm 5,6\%$ *nonCGRP*- und $8,1 \pm 6,4\%$ *lowCGRP*-Neurone, während die *highCGRP*-Neurone mit $82,5 \pm 8,5\%$ deutlich überwogen. Ein ähnliches Bild zeigte sich im Rückenmark, wo sich im Vorderhorn $11,3 \pm 9,3\%$ *nonCGRP*-, $12,0 \pm 6,7\%$ *lowCGRP*- und $76,6\% \pm 18,9\%$ *highCGRP*-Neurone fanden.

3.1.3.3 Die Motoneuronentypen definieren sich maßgeblich durch ihren Gehalt an α CGRP

Um herauszufinden, ob beide CGRP Isoformen gleichmäßig zu der Differenzierung der Motoneuronentypen beitragen oder eine der beiden Isoformen von Motoneuronen beziehungsweise den verschiedenen Subtypen bevorzugt exprimiert wird, wurden die Expressionslevel der Isoformen sowohl auf Protein- als auch mRNA-Ebene untersucht.

Protein-Ebene

Da die zur Verfügung stehenden CGRP-Antiseren aufgrund der hohen Sequenz-Homologie nicht zwischen den beiden Isoformen unterscheiden, wurde die CGRP-Immunoreaktivität (IR) in beide Isoformen exprimierenden Wildtyp mit der CGRP-IR in Mäusen mit einer Deletion des α CGRP oder des β CGRP verglichen. Der β CGRP-defiziente Stamm wurde erst im Zuge dieser Arbeit erworben und ist bisher nicht charakterisiert, die Vollständigkeit der Deletion wurde vor Durchführung der hier beschriebenen Untersuchung mit PCR und *in situ*-Hybridisierung bewiesen (siehe Abb 3.1.3.2.).

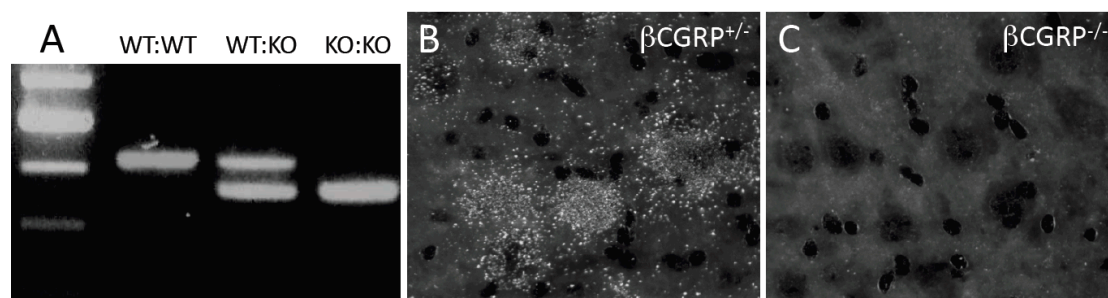


Abb. 3.1.3.2. Nachweis der Gendeletion in β CGRP-defizienten Mäusen. (A) Die Genotypisierungs-Primer ergeben eine 400bp-Bande für das Wildtyp-Allel (WT) und eine 350bp-Bande für das Knockout-Allel (KO). Homozygote Tiere zeigen nur eine der Banden, heterozygote Tier die Banden für beide Allele. (B und C) *in situ*-Hybridisierung mittels einer β CGRP-spezifischen Ribosonde, die im heterozygoten Tier (B) deutliche Signale über den Motoneuronen des Nucleus hypoglossus zeigte, während im β CGRP-defizienten Tier (C) keine β CGRP-mRNA detektiert wurde. Balken in (B) entspricht 50 μ m und gilt auch für (C).

Um auch äußerst geringe Proteinlevel sichtbar zu machen, wurde sich hier nicht der Immunfluoreszenz, sondern der Enzym-basierten DAB/Ni-Farbreaktion bedient und auf eine Ko-markierung der Motoneurone mit ChAT verzichtet. In allen motorischen Arealen fand sich im Wildtyp eine starke, perinukleäre Farbreaktion der Motoneurone, hier gezeigt für je einen Vertreter der oben definierten Gruppen: Ncl. oculomotorius (Abb. 3.1.3.3. A-C), Ncl. facialis (Abb. 3.1.3.3. D-F) und Ncl. ambiguus (Abb. 3.1.3.3. G-I). Sowohl die Anzahl CGRP-positiver Neurone (nur wenige in III, circa 2/3 in VII und fast alle in Xa) als auch die Verteilung der Intensität der IR (*high* vs. *low*) entsprach dabei den Beobachtungen der Immunfluoreszenz, wobei eine Signalsättigung bei *high*CGRP-Neuronen und eine intensivere Färbung der *low*CGRP-Neurone aufgrund der wesentlich sensitiveren Detektionsmethode zu berücksichtigen ist. In den korrespondierenden Kernarealen α CGRP-defizienter Mäuse (B, E, H) war die verbleibende β CGRP-IR zwar noch detektierbar, bewegte sich in den Somata der Motoneurone aber nur minimal oberhalb des Gewebehintergrunds. Sensorische Fasern, die z.B. am Ncl. ambiguus vorbeiziehen (Pfeile in G und H), als auch jene im Hinterhorn des Rückenmarks und der Fasciculus gracilis und cuneatus im Hirnstamm (nicht gezeigt) zeigten unter der α CGRP-Defizienz nur eine leichte Abschwächung des Signals im Vergleich zum Wildtyp. Im Gegensatz dazu war die verbleibende α CGRP-IR in den Motoneuronen β CGRP-defizienter Tiere (C, F, I) im Vergleich zum Wildtyp unverändert. Die oben definierten Motoneuronentypen resultieren also hauptsächlich aus ihrem Gehalt an α CGRP, während β CGRP – zumindest auf der Proteinebene bzw. der IR im Soma – eine untergeordnete Rolle spielt.

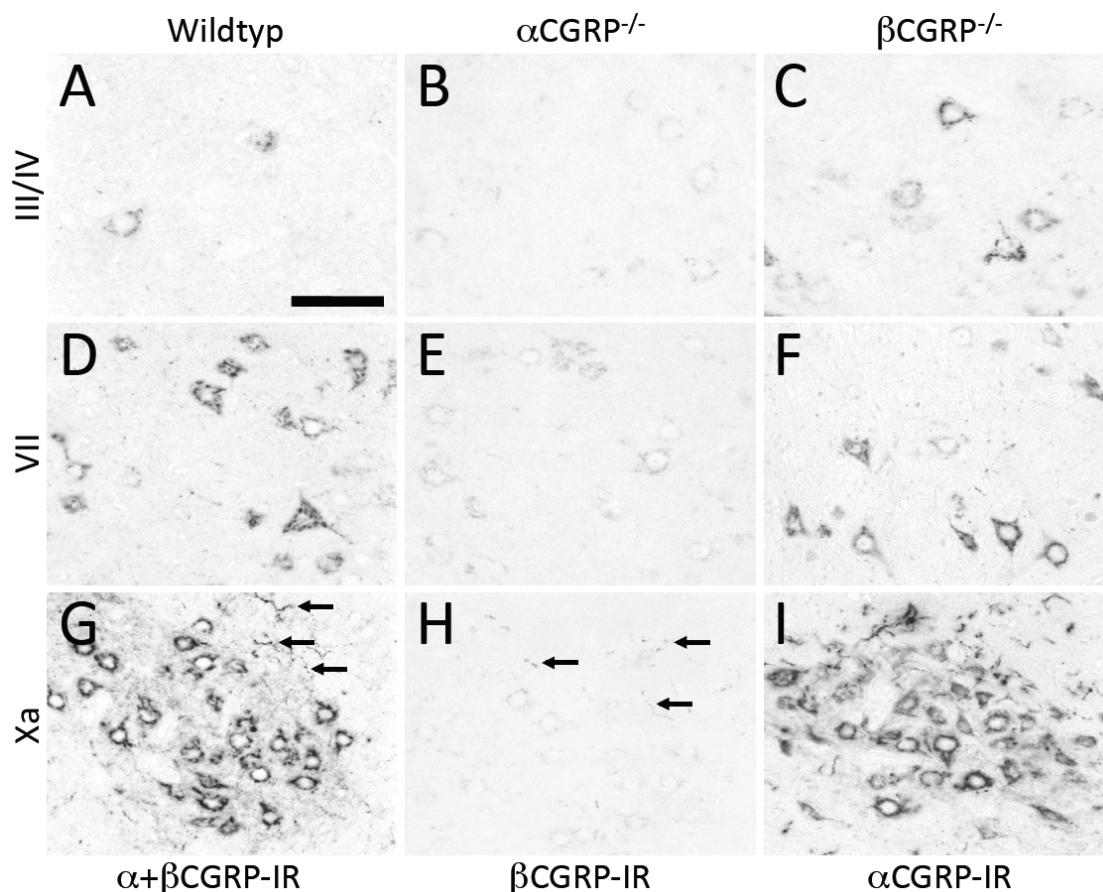


Abb. 3.1.3.3.: CGRP-Immunoreaktivität im Wildtyp bzw. in α CGRP- und β CGRP-defizienten Motoneuronen. Auch bei der enzymbasierten Immunhistochemie zeigte sich im Wildtyp (linke Spalte) die in der Doppelfluoreszenz beobachtete Verteilung der CGRP-immunoreaktiven Motoneurone: wenige im III/IV (A), ca. 2/3 in VII (D) und die große Mehrheit in Xa (G). Zu beachten ist dabei allerdings, dass durch die erhöhte Sensitivität der DAB/Ni-Farbreaktion eine Signalsättigung in den *high*CGRP-Motoneuronen und eine Signalverstärkung der *low*CGRP-Motoneurone auftritt, sodass sich diese nicht mehr eindeutig voneinander differenzieren lassen. In α CGRP-defizienten Tieren lag die verbleibende β CGRP-Immunoreaktivität (IR) in den Motoneuronen trotz 4fach höherer Konzentrierung des Antiserums nur marginal über dem Hintergrund. In sensorischen Fasern, die am Xa vorbeiziehen, war die β CGRP-IR jedoch noch deutlich erkennbar (Pfeile in G und H). Die in β CGRP-defizienten Tieren verbleibende α CGRP-IR (rechte Spalte) in den Motoneuronen unterschied sich nicht von der *gesamt*CGRP-IR im Wildtyp. Balken in A entspricht 50 μ m und gilt auch für B-I.

mRNA-Ebene

Um herauszufinden, ob auch die zugrundeliegenden Gene *calca* und *calcb* in Motoneuronen ähnliche Unterschiede in ihrem Expressionsmuster zeigen, wurde auf Gehirnschnitten von Wildtyp-Mäusen eine *in situ*-Hybridisierung mit Ko-Markierung einer nicht-radioaktiven (Dig) Ribosonde gegen den Motoneuronenmarker VACHT mit einer radioaktiven (35 S) Ribosonde gegen α CGRP oder β CGRP durchgeführt. Bei α CGRP (Abb. 3.1.3.4. A-F) stimmte das detektierte mRNA-Expressionsmuster nahezu vollständig mit den in der Immunhistochemie beobachteten Verteilung der Motoneuronentypen überein. So zeigten sich sowohl im Ncl.

oculomotorius (A und B) als auch dem Ncl. facialis (C und D) vereinzelte Neurone mit hohem mRNA-Gehalt (Dreifachpfeil), aber auch Motoneurone mit geringeren mRNA-Level (Doppelpfeil) sowie Motoneurone ohne Expression des *calca*-Gens (Einfachpfeil). Im Ncl. ambiguus (E und F) hingegen zeigten nahezu alle Motoneurone wie auch auf der Proteinebene eine mittlere bis hohe α CGRP-Expression.

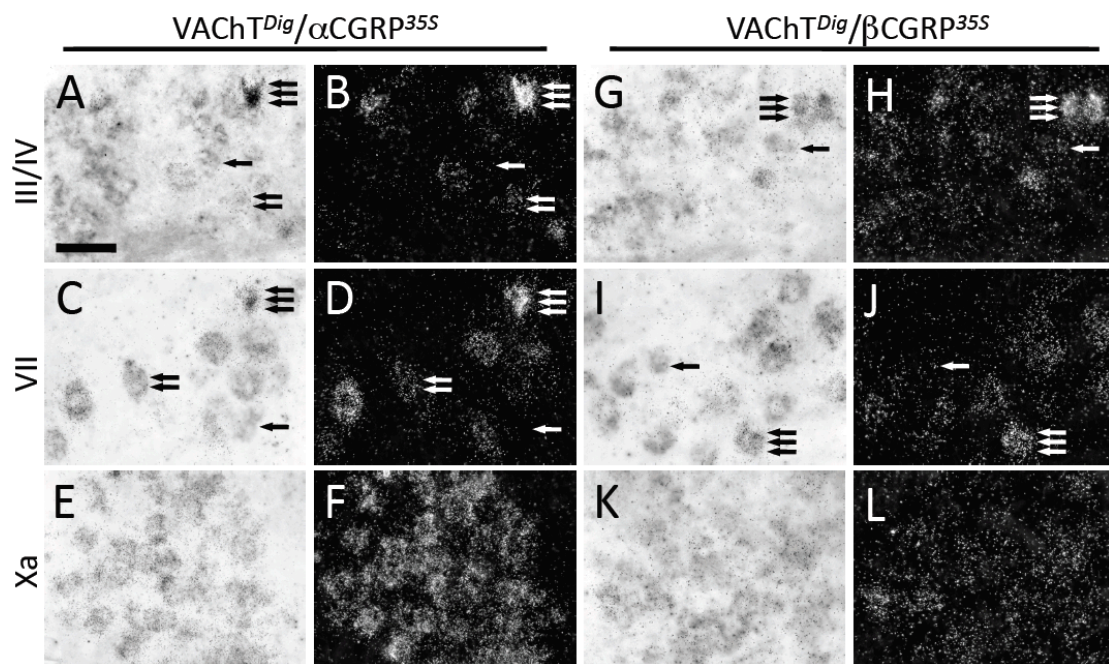


Abb. 3.1.3.4.: *calca*- und *calcb*-mRNA Expression in Wildtyp-Motoneuronen (P120). Die *in situ*-Doppelhybridisierung mit Dig-markierter VACHT-Ribosonde zur Identifikation der Motoneuronen und einer radioaktiv-markierten Ribosonde gegen *calca* (A-F) bzw. *calcb* (G-L) zeigte für *calca* ein ähnliches Bild wie auf Proteinebene beobachtet: sowohl im Ncl. oculomotorius/trochlearis (III/IV, A und B) als auch im Ncl. facialis (VII, C und D) zeigten sich Motoneurone mit starker mRNA-Expression (Dreifachpfeile), mit schwacher mRNA-Expression (Einfachpfeile) sowie Motoneurone ohne *calca*-Expression (Einfachpfeile), während im Ncl. ambiguus (Xa, E und F) fast alle Motoneurone eine starke *calca*-Expression aufwiesen. Auch bei *calcb* fanden sich in III/IV (G und H) und VII (I und J) einige wenige stark-exprimierende Motoneurone (Dreifachpfeile) und Motoneurone ohne *calcb*-Expression (Einfachpfeile), doch zeigten sowohl in diesen Kernarealen als auch in Xa die meisten Motoneurone eine moderate *calcb*-Expression. Balken in A entspricht 50 μ m und gilt auch für B-L).

Auch für β CGRP (Abb 3.1.3.4. G-L) fanden sich im Ncl. oculomotorius (G und H) und im Ncl. facialis (I und J) vereinzelt Motoneurone mit hohem mRNA-Gehalt (Dreifachpfeil) oder ohne Expression des *calcb*-Genes (Einfachpfeil). In beiden Kernen ebenso wie im Ncl. ambiguus (K und L) zeigte ein Großteil der Motoneurone jedoch eine moderate β CGRP-Expression. Diese gleichmäßige und moderate *calcb*-Expression über alle Motoneuronen(areale) hinweg unterschied sich also deutlich von den Beobachtungen der Immunhistochemie und der *calca*-Expression, insbesondere im Fall des Ncl. oculomotorius mit niedriger

Protein- und *calca*-Expression und des Ncl. ambiguus mit vornehmlich starker Protein- und *calca*-Expression.

Entsprechend ist festzuhalten, dass Motoneurone auf der Protein- und mRNA-Ebene eine unterschiedliche Expression der beiden CGRP-Isoformen aufweisen, wobei sich die in der Immunhistochemie beobachteten variierenden Protein-Expressionslevel der drei Motoneuronentypen vornehmlich auf das zugrundeliegende Level der *calca*-mRNA zurückführen lassen.

3.1.3.4 Die Vulnerabilität einer Nuclei-Gruppe korreliert mit derjenigen des dominanten Motoneuronentyps

Um herauszufinden, ob die unterschiedliche Vulnerabilität der motorischen Nuclei innerhalb der ALS-Pathologie mit der oben gezeigten variierenden Zusammensetzung aus den Motoneuronentypen korreliert, wurden alle motorischen Nuclei von P130-150 Wildtyp- und SOD1-transgenen Mäusen im Endstadium in der ChAT/CGRP-Doppelimmunfluoreszenz verglichen (Abb. 3.1.3.5.).

In der oculomotorischen Gruppe (hier gezeigt: Ncl. oculomotorius, III) überwogen im Wildtyp *nonCGRP*-Neurone gegenüber einigen wenigen *lowCGRP*- und *highCGRP*-Neuronen (Abb. 3.1.3.5.A). Diese CGRP-exprimierenden Neurone tauchten im Endstadium SOD1-transgener Mäuse nur noch äußerst selten auf, während die Zahl an *nonCGRP*-Neuronen unverändert schien (Abb. 3.1.3.5. B). Ein ähnliches Bild fand sich in der facialis Gruppe (hier gezeigt: Ncl. facialis, VII), wo im Wildtyp eine ausgeglichene Verteilung der drei Motoneuronentypen zu beobachten war (Abb. 3.1.3.5. C). In SOD1-transgenen Mäusen (Abb. 3.1.3.5. D) hingegen zeigten überlebende Motoneurone nur vereinzelt CGRP-Expression (siehe Pfeil), während es sich in der Mehrheit um *nonCGRP*-Neurone handelte und CGRP-Immunoreaktivität vor allem in den ALS-relatierten Vakuolen auftrat. In der spinomedullären Gruppe (hier gezeigt: Ncl. ambiguus, Xa) dominierten im Wildtyp die *highCGRP*-Neurone (Abb. 3.1.3.5. E), deren Anzahl in SOD1-transgenen Mäusen im Endstadium (Abb. 3.1.3.5. F) deutlich reduziert war. Auch hier ging der Verlust von Motoneuronen mit einer massiven Vakuolisierung einher (vergleiche 3.1.2.1. und Abb. 3.1.2.)

Eine Quantifizierung (n = 3 Tiere/Genotyp und 10 Werte/Tier/Nucleus) bestätigte den Zusammenhang zwischen der Vulnerabilität eines motorischen Nucleus mit seinem Gehalt an *highCGRP*-Motoneuronen (siehe Abb. 3.1.3.6. sowie Tabelle 3.1.3.1.). Der durchschnittliche Gesamtverlust an Motoneuronen in der als resistent geltenden oculomotorischen Gruppe war mit 6,5% (Ncl. III/IV: 20,1%, $p \leq 0,01$; Ncl. VI: +7,0%, ns) nicht signifikant, wobei der zu verzeichnende Verlust ausschließlich auf die wenigen *highCGRP*- (-64,3% in Ncl. III/IV, -100% in Ncl. IV) und *lowCGRP*-Neurone (-91,3% in Ncl. III/IV, -57,9% in Ncl. VI) zurück-

zuführen war, während *nonCGRP*-Neurone keine signifikanten Verluste zeigten (-1,7% in Ncl. III/IV, +12,0% in Ncl. VI). Die faciale Gruppe zeigte einen moderaten Gesamtverlust von durchschnittlich 45,3% (Ncl. V: 43,1%; Ncl. VII: 52,7%, Ncl. XII: 42,0%, $p \leq 0,001$).

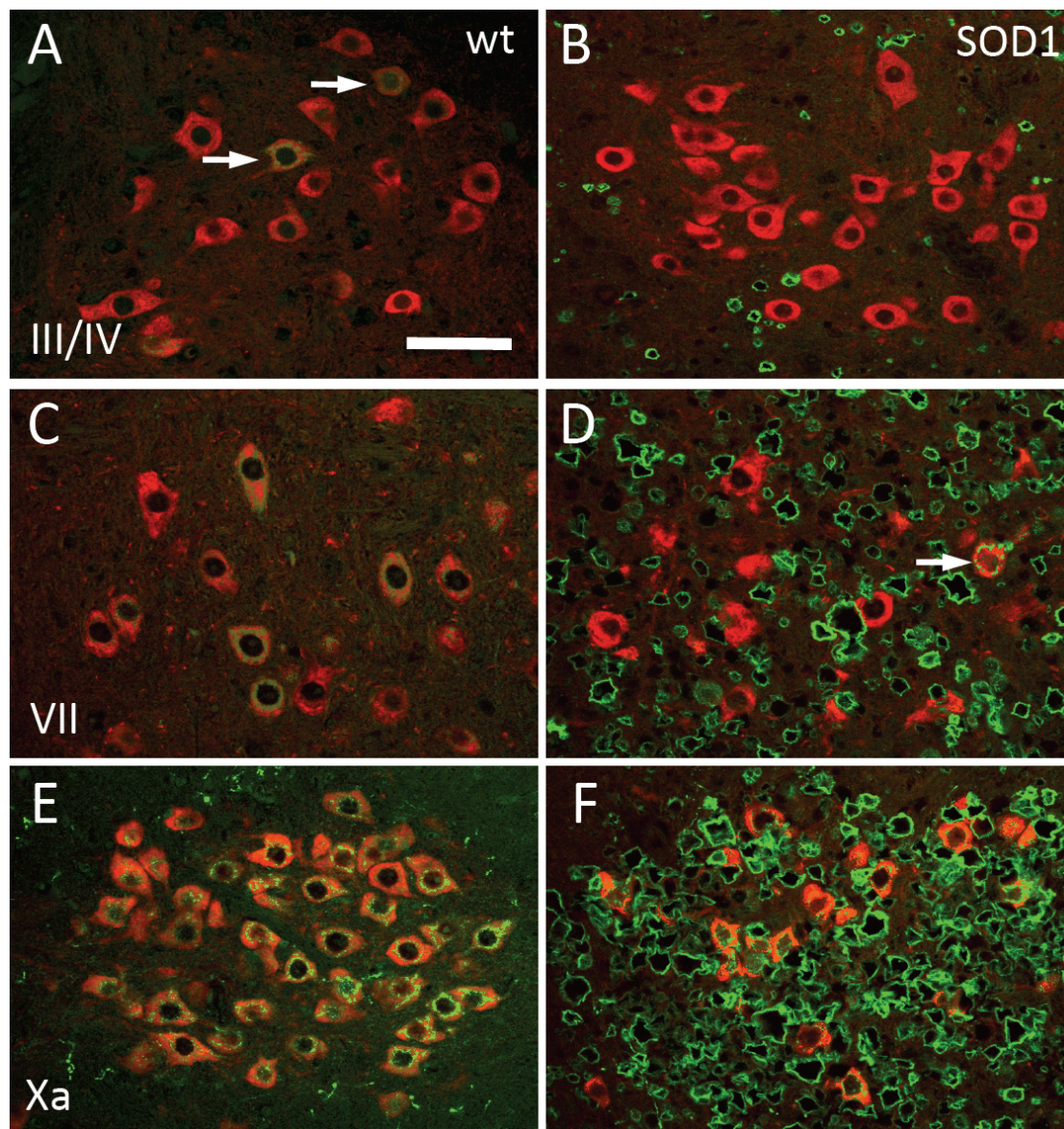


Abb. 3.1.3.5.: CGRP-Immunoreaktivität in Motoneuronen von P120 Wildtyp- und SOD1-transgenen Tieren. Doppelfluoreszenzmarkierung des Motoneuronenmarkers ChAT (rot) und CGRP (grün) im Nucleus (Ncl.) oculomotorius/trochlearis (III/IV, A und B), Ncl. facialis (VII, C und D) und Ncl. ambiguus (Xa, E und F) im Wildtyp (rechte Spalte) und SOD1-transgenen Tier (rechte Spalte) an P120 (= Endstadium). Die wenigen, in III/IV vorhandenen CGRP-exprimierenden Motoneurone (Pfeile in A), waren im SOD1-Endstadium verschwunden. Auch in VII mit im WT ca. 60% CGRP-positiven Motoneuronen verblieben im SOD1-Endstadium nur vereinzelte CGRP-positive Motoneurone (Pfeile in D), die ebenso wie jene in Xa meist eine deformierte Morphologie (vergleiche mit Wildtyp links) aufwiesen, die zugleich mit einer massiven Vakuolisierung einherging (vergleiche Abb. 3.1.2.). Balken in A entspricht 50 μm und gilt auch für B-F).

Auch in dieser Gruppe wiesen *highCGRP*-Neurone die größten Verluste auf (80,8% im Ncl. V; 80,9% im Ncl. VII; 81,9% im Ncl. XII, $p \leq 0,001$), gefolgt von den *lowCGRP*-Neuronen (48,8% im Ncl. V; 57,6% im Ncl. VII; 39,4% im Ncl. XII; $p \leq 0,001$), während die Anzahl an *nonCGRP*-Neuronen auch in diesen Nuclei keinen Unterschied zum Wildtyp zeigte (-1,9% im Ncl. V; +2,1% im Ncl. VII, -7,3% im Ncl. XII; ns). Der größte Gesamtverlust fand sich in der spinomedullären Gruppe mit durchschnittlich 71,5% (Ncl. Xa: 77,2%, Sc: 65,5%, $p \leq 0,001$). In diesem Fall war der Gesamtverlust sogar ausschließlich auf den Verlust an *highCGRP* (-87,9% in Ncl. Xa und Sc, $p \leq 0,001$) zurück zu führen, da *lowCGRP*-Neurone keine Veränderung gegenüber dem Wildtyp aufwiesen (-25,3% im Ncl. Xa, +11,1% in Sc) und der Verlust von *nonCGRP*-Neuronen (-28,8% im Ncl. Xa, $p \leq 0,01$) aufgrund des geringen Ausgangswertes im Wildtyp (<10% bzw. Ø 2-3 Neurone, siehe Tabelle 3.1.3.1.) keine Rolle spielte.

Tabelle. 3.1.3.1.: Quantifizierung der Motoneurontypen innerhalb der somatomotorischen Kernareale im Wildtyp und Endstadium SOD1-transgener Mäuse. MN: Motoneurone, Diff.: Differenz, WT: Wildtyp P120, SOD1: SOD1-transgene Tiere im Endstadium, III/IV: Ncl. oculomotorius/trochlearis, VI: Ncl. abducens, V: Ncl. motorius n. trigemini, VII: Ncl. facialis, XII: Ncl. hypoglossus, Xa; Ncl. ambiguus n. vagi, Sc: Rückenmark (spinal cord).

Ncl.	Anzahl MN / Schnitt			<i>highCGRP</i>			<i>lowCGRP</i>			<i>nonCGRP</i>		
	WT	SOD1	Diff. [%] (p)	WT	SOD1	Diff. [%] (p)	WT	SOD1	Diff. [%] (p)	WT	SOD1	Diff. [%] (p)
III / IV	42.1 ± 5.8	33.5 ± 5.1	-20.5 (***)	0.5 ± 0.6	0.2 ± 0.5	-64.3 (*)	8.5 ± 3.1	0.7 ± 1.0	-91.7 (***)	33.2 ± 5.9	32.6 ± 5.1	+1.7 (ns)
VI	12.1 ± 3.2	13.0 ± 2.4	+7.4 (ns)	0.1 ± 0.3	0.0 ± 0.0	-100 (ns)	0.6 ± 0.9	0.3 ± 0.6	-57.9 (ns)	11.4 ± 3.0	12.7 ± 2.3	+12.0 (ns)
V	42.8 ± 6.0	24.4 ± 5.6	-43.1 (***)	13.0 ± 4.3	2.5 ± 2.0	-80.8 (***)	15.7 ± 3.5	8.0 ± 3.9	-48.8 (***)	14.1 ± 3.9	13.8 ± 5.9	-1.9 (ns)
VII	47.9 ± 5.7	22.7 ± 6.3	-52.7 (***)	17.7 ± 3.4	3.2 ± 1.6	-82.0 (***)	18.9 ± 5.2	8.0 ± 5.3	-57.6 (***)	11.2 ± 2.8	11.4 ± 4.2	+2.1 (ns)
XII	69.0 ± 15.4	40.0 ± 7.0	-42.1 (***)	18.8 ± 6.2	3.3 ± 2.2	-82.5 (***)	30.6 ± 11.1	18.5 ± 4.2	-39.4 (***)	19.6 ± 5.3	18.1 ± 4.1	-7.3 (ns)
Xa	30.5 ± 6.5	6.8 ± 3.8	-77.6 (***)	25.4 ± 6.5	3.1 ± 3.0	-87.9 (***)	2.5 ± 2.0	1.9 ± 1.4	-25.3 (ns)	2.7 ± 1.2	1.9 ± 1.1	-28.8 (**)
Sc	10.1 ± 3.0	3.5 ± 1.4	-65.5 (***)	7.7 ± 2.8	0.9 ± 1.1	-87.9 (***)	1.2 ± 1.5	1.3 ± 1.1	+11.1 (ns)	1.2 ± 1.2	1.2 ± 0.9	±0 (ns)

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die verschiedenen Nuclei-Gruppen deutliche Unterschiede in ihrer Vulnerabilität zeigten, wobei die oculomotorische Gruppe als ALS-resistent gelten konnte, die faciale Gruppe eine moderate und die spinomedulläre eine hohe Vulnerabilität gegenüber der ALS-Pathologie aufwies. Diese Unterschiede ließen sich mit der jeweiligen Zusammensetzung eines Nucleus aus den Motoneurontypen erklären, da diese ebenfalls unterschiedliche Vulnerabilitäten gegenüber der ALS aufwiesen: Unabhängig vom Nucleus waren *nonCGRP*-Motoneurone resistent, *lowCGRP*-Motoneurone leicht und *highCGRP*-Motoneurone hoch vulnerabel. Dominierten in einer Gruppe ALS-resistente *nonCGRP*-Motoneurone (oculomotorische Gruppe), erwiesen sich die dazugehörigen Nuclei ebenfalls als resistent, dominierten in einer Gruppe die vulnerablen *highCGRP*-Motoneurone (spinomedulläre Gruppe), waren auch die dazugehörigen Nuclei hoch vulnerabel.

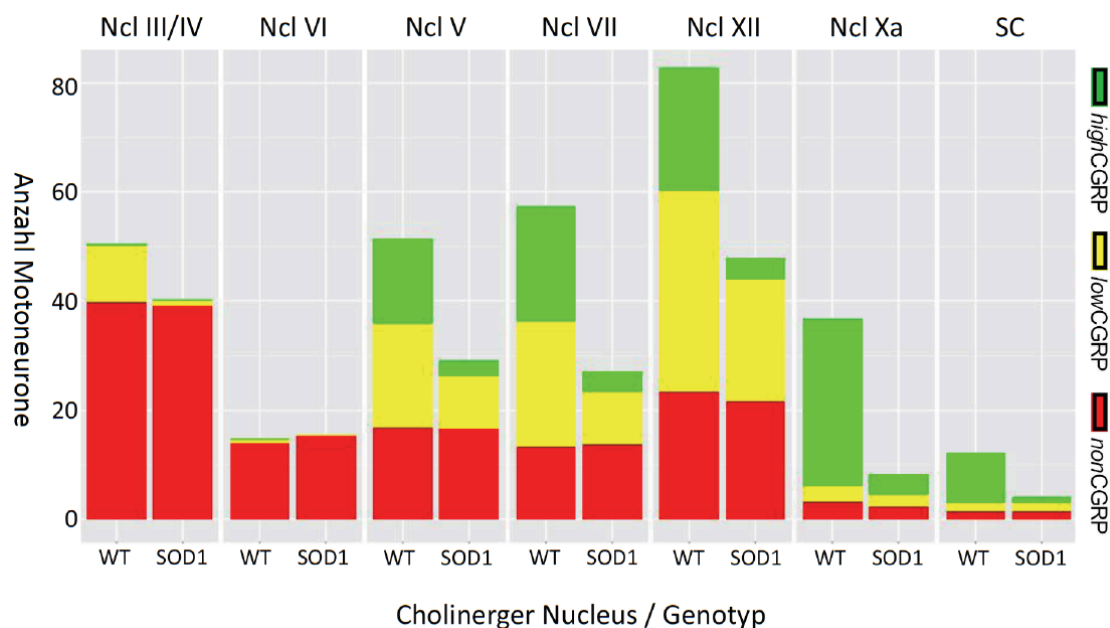


Abb. 3.1.3.6.: Quantifizierung der Motoneuronentypen innerhalb der somatomotorischen Kernare im Wildtyp und Endstadium SOD1-transgener Mäuse. WT: Wildtyp P120, SOD1: SOD1-transgene Tiere im Endstadium, III/IV: Ncl oculomotorius/trochlearis, VI: Ncl. abducens, V: Ncl. motorius n. trigemini, VII: Ncl. facialis, XII: Ncl. hypoglossus, Xa; Ncl. ambiguus, SC: Rückenmark (spinal cord). Vergleiche die Dominanz der *nonCGRP*-Neurone (rot) in den oculomotorischen Nuclei III, IV und VI, die ausgeglichene Verteilung aller drei Motoneuronentypen in V, VII und XII und die Dominanz der *highCGRP*-Motoneurone (grün) in Xa und Sc im Wildtyp mit den relativen Anteilen in Abb. 3.1.3.1. Zu bemerken ist hier die im SOD1-Endstadium geringe Reduktion der Gesamtneuronenzahl in der oculomotorischen Gruppe (III, IV, VI), der moderate Verlust an Motoneuronen in der facialis Gruppe (V, VII, XII) und der starke Neuronen-Verlust in der spinomedullären Gruppe (Xa und Sc). Ebenso bemerkenswert ist die unabhängig der Nuclei kaum veränderte Anzahl *nonCGRP*-Neurone (rot), die moderat verringerte Anzahl an *lowCGRP*-Motoneuronen (gelb) und der starke Verlust an *highCGRP*-Motoneuronen (grün) im SOD1-Endstadium im Vergleich zum Wildtyp. Fehlerbalken und Signifikanzzeichen sind der Übersichtlichkeit wegen weglassen, sie sind ebenso wie Absolutwerte und prozentuale Veränderungen der Tabelle 3.1.3.1. zu entnehmen.

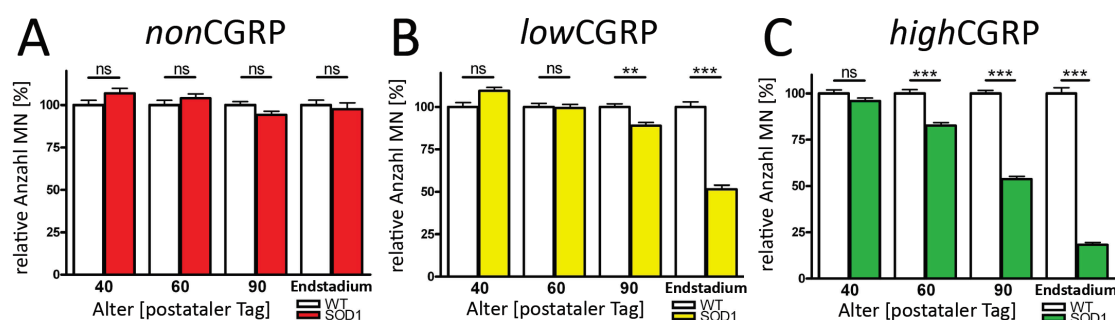


Abb. 3.1.3.7.: Vulnerabilität der Motoneuronentypen innerhalb des Zeitverlaufs der ALS-Pathogenese SOD1-transgener Mäuse. Anzahl der Motoneurone (MN) des jeweiligen Typs im Wildtyp (WT) ist als 100% gesetzt, die Anzahl der Motoneurone im SOD1-transgenen Tier relativiert zum Wildtyp desselben Alters. Zwischen den Wildtypen verschiedenen Alters waren keine signifikanten Veränderungen zu beobachten. (A) *nonCGRP*-Motoneurone degenerierten bis ins Endstadium hinein nicht, schienen also ALS-resistent. (B) *lowCGRP*-Motoneurone zeigten beginnend am postnatalen Tag (P) 90 die ersten Verluste und waren im Endstadium auf ca. die Hälfte reduziert. (C) *highCGRP*-Motoneurone begannen bereits an P60 mit der Degeneration, waren an P90 schon auf die Hälfte reduziert, im Endstadium verblieben weniger als 25%. ns: nicht signifikant, (**): $p < 0,01$; (***): $p < 0,001$.

3.1.3.5 Zeitverlauf der Degeneration von *highCGRP*- und *lowCGRP*-Motoneuronen

Um festzustellen, ob sich die Motoneurone nicht nur generell in ihrer Vulnerabilität unterscheiden, sondern auch der zeitliche Verlauf der Degeneration Unterschiede aufweist, wurde die Untersuchung der ChAT/CGRP-Doppelfluoreszenz auf P40, P60 und P90 Wildtyp- und SOD1-transgene Tiere ausgeweitet und die Motoneuronentypen innerhalb der facialis Gruppe (Ncl. V, VII und XII) quantifiziert ($n = 3-5$ Tiere/Genotyp/Stadium und 10 Werte/Tier/Nucleus) und mit den Ergebnissen aus der Studie des Endstadiums verglichen. Hier wurden jedoch die aus den einzelnen Nuclei erhaltenen Werte für jeden Motoneuronentyp zusammengefasst ($n = 90-120$ Werte/Motoneuronentyp/Genotyp/Stadium), um einen statistisch robusten und von der Lage der Motoneuronen unabhängigen Wert zu erhalten. Auf den Einbezug der Nuclei anderer Gruppen wurde in dieser Studie verzichtet, da sich die geringen Anteile von *highCGRP*- und *lowCGRP*-Motoneuronen in der oculomotorischen Gruppe bzw. von *lowCGRP*- und *nonCGRP*-Motoneuronen in der spinomedullären Gruppe verfälschend auf prozentuale Verlust- und Signifikanzwerte auswirken würden.

Während *nonCGRP*-Motoneurone über alle untersuchten Stadien hinweg keinen signifikanten Verlust aufwiesen (Abb. 3.1.3.7. A), war die Anzahl an *lowCGRP*-Motoneuronen (Abb. 3.1.3.7. B) ab P90 signifikant reduziert (WT: $100 \pm 2,5\%$ vs. SOD1: $88,9 \pm 2,0\%$; $-11,1\%$; $p \leq 0,01$), gefolgt von einer weiteren Reduzierung im Endstadium (WT: $100 \pm 3,0\%$ vs. SOD1: $51,4 \pm 2,5\%$; $-48,6\%$; $p \leq 0,001$). Im Fall der *highCGRP*-Motoneurone (Abb. 3.1.3.7. C) begann die Degeneration bereits an P60 (WT: $100 \pm 2,0\%$ vs. SOD1: $86,2 \pm 1,7\%$; $-17,4\%$; $p \leq 0,001$), mit zunehmendem Verlust an P90 (WT: $100 \pm 1,6\%$ vs. SOD1: $53,7 \pm 1,5\%$; $-46,3\%$; $p \leq 0,001$) und im Endstadium (WT: $100 \pm 3,1\%$ vs. SOD1: $18,3 \pm 1,3\%$; $-81,7\%$; $p \leq 0,001$). Die Degeneration der *highCGRP*-Motoneurone war folglich nicht nur massiver, sondern setzte auch früher ein als der Verlust an *lowCGRP*-Motoneuronen, während sich *nonCGRP*-Motoneurone auch in dieser stadienübergreifenden Untersuchung als ALS-resistent erwiesen.

3.1.4 Expressionsmuster der CGRP-Rezeptorkomplexe

Sowohl im Rückenmark (Ringer et al. 2009) als auch dem Hirnstamms (siehe 3.1.2.1.) wurde eine enge zeitliche Relation zwischen der Veränderung der CGRP-Immunoreaktivität und der Astrozytenaktivierung beobachtet. Um die Frage zu klären, ob Astrozyten und andere ALS-relevanten Zelltypen den CGRP-Rezeptorkomplex exprimieren und somit auf die aktive Ausschüttung von CGRP durch die Motoneuronen bzw. die Freisetzung der CGRP-Vakuolen durch Degeneration reagieren konnten, sollte die Expression von CRLR und RAMP1 sowohl auf Protein- als auch mRNA-Ebene geklärt werden. Besonderes Augenmerk lag dabei auf einer eventuellen Veränderung der Expression im Krankheitsverlauf der ALS.

3.1.4.1 CRLR-Immunoreaktivität in Astrozyten

Eine Ko-Markierung von CRLR mit spezifischen Markern für Astrozyten (GFAP), Mikroglia (Iba1) und Motoneurone (ChAT) ergab, dass nur Astrozyten diese CGRP-Rezeptorkomponente exprimieren (siehe Abb. 3.1.4.1.). Die im Wildtyp beobachtete Ko-Lokalisation von GFAP und CRLR (A) war auch in den morphologisch bereits stark veränderten Astrozyten im SOD1-Endstadium (B) vorhanden. Zwischen CRLR und dem Mikrogliamarker Iba1 ergab sich weder im Wildtyp noch in SOD1-transgenen Tieren eine Ko-Lokalisation (C+D), gleiches galt für CRLR und den Motoneuronenmarker ChAT (E-F).

Das zur Verfügung stehende Antiserum gegen RAMP1 wurde mehrfach auf unterschiedlich fixierten Geweben und primären Astrozytenkulturen getestet, erzeugte jedoch in keinem Fall eine aussagekräftige Immunoreaktivität.

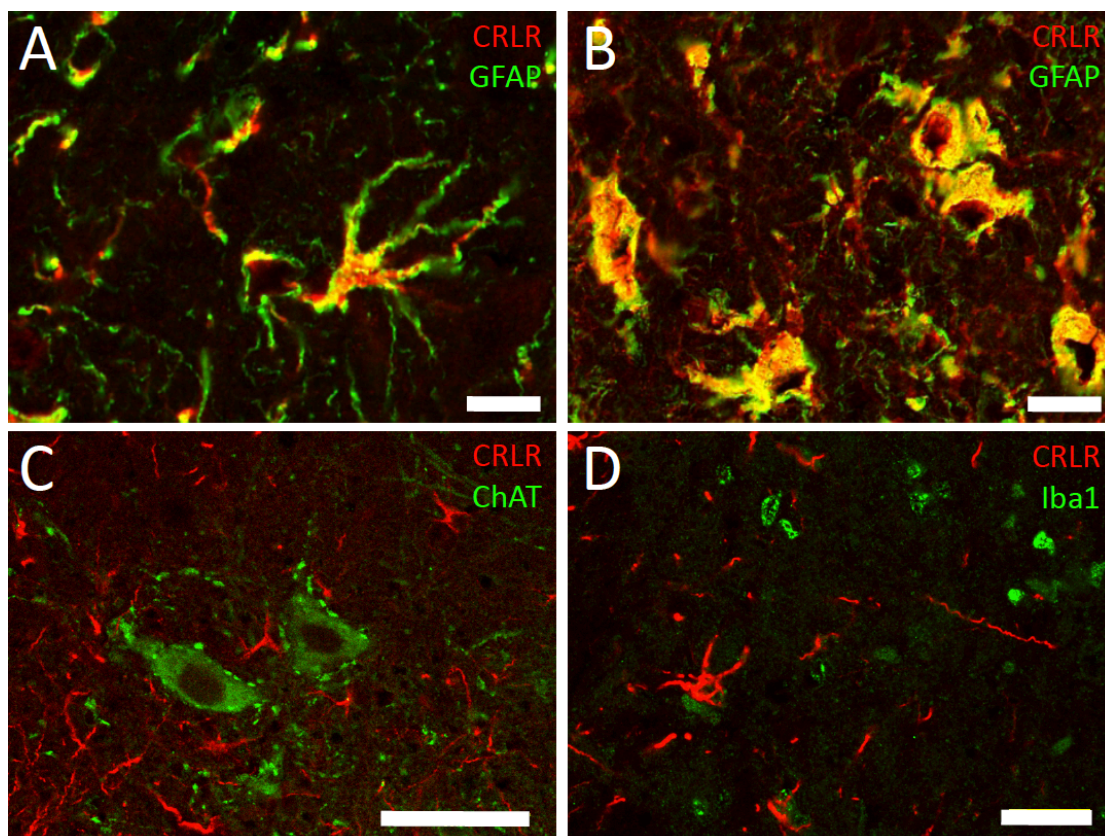


Abb. 3.1.4.1.: CRLR-Proteinexpression in ALS-relevanten Zelltypen. Doppelfluoreszenzen von CRLR (rot) mit Astrozytenmarker GFAP (grün) im Wildtyp P120 (A) und im SOD1-transgenen Tier im Endstadium (B), dem Motoneuronenmarker ChAT (C) und dem Mikrogliamarker Iba 1 (D), beide im Wildtyp P70. Balken in A und B entspricht 20 µm, in C 50 µm und in D 10 µm.

3.1.4.2 Etablierung von Ribosonden für CRLR und RAMP1-3

Zur Aufklärung der mRNA-Expressionsprofile und deren potentiellen Veränderungen im Krankheitsverlauf der ALS wurden Ribosonden gegen die beiden CGRP-Rezeptorkomponenten CRLR und RAMP1 sowie die beiden anderen Dimerisierungspartner des CRLR, RAMP2 und RAMP3, etabliert. Zur Spezifitätskontrolle wurden zunächst Gewebsschnitte, deren Expression der jeweiligen Rezeptorkomponente aus der Literatur bekannt war (Ueda et al., 2001), mit *sense*- und *antisense*-Sonden hybridisiert (siehe Abb. 3.1.4.2.). Die *antisense*-Sonde für CRLR (A) zeigte die stärksten Reaktionen in den medialen Habenulae-kernen (1) und im CA3 des Hippokampus (2). Außerdem waren in verschiedenen Gehirnregionen, v.a. in Kortex (3) und Hypothalamus (4), Signale auf Einzelzellen zu finden (I), die auf eine Expression in bestimmten Neuronentypen und/oder Astrozyten schließen ließen. Bei RAMP1 (C) zeigten sich die stärksten *antisense*-Signale in CA1-3 des Hippokampus (1), im Gyrus dentatus (2) sowie auf den Purkinjezellen des Kleinhirns (nicht gezeigt, vergleiche Ueda). Wie bei CRLR waren in verschiedenen Gehirnregionen (3,4) in der Hochvergrößerung (J) Einzelzellsignale zu beobachten. Eine eindeutige neuronale Expression von RAMP2 (E) fand sich nur im Gyrus dentatus (1), in allen Gehirnregionen trat außerdem ein Signal über dem Endothel von Blutgefäßen auf (K, vergleiche Ueda et al. 2001). Starke *antisense*-Signale für RAMP3 (G) fanden sich vor allem im Thalamus, außerdem war in einigen anderen Regionen eine deutliche, neuronale Expression zu beobachten, hier gezeigt für das Striatum (L). Die Signale der *antisense*-Sonden in Fasertrakten wie dem Corpus callosum (cc), der Capsula externa und interna (ce, ci), dem Fornix (f) sowie den Pedunculi cerebellaris (pc) wiesen zusätzlich auf eine Expression in den dort lokalisierten Astrozyten hin. Zu bemerken ist allerdings, dass die Radioaktivsignale mit Ausnahme von RAMP3 generell sehr schwach ausfielen, weshalb durch die notwendigen, langen Expositionszeiten bei CRLR, RAMP1 und RAMP2 grundsätzlich ein hohes Hintergrundsignal entstand. Die als Negativkontrolle verwendeten *sense*-Sonden (B, D, F, H) zeigten in allen Fällen nur ein leichtes Hintergrundsignal in Fasertrakten.

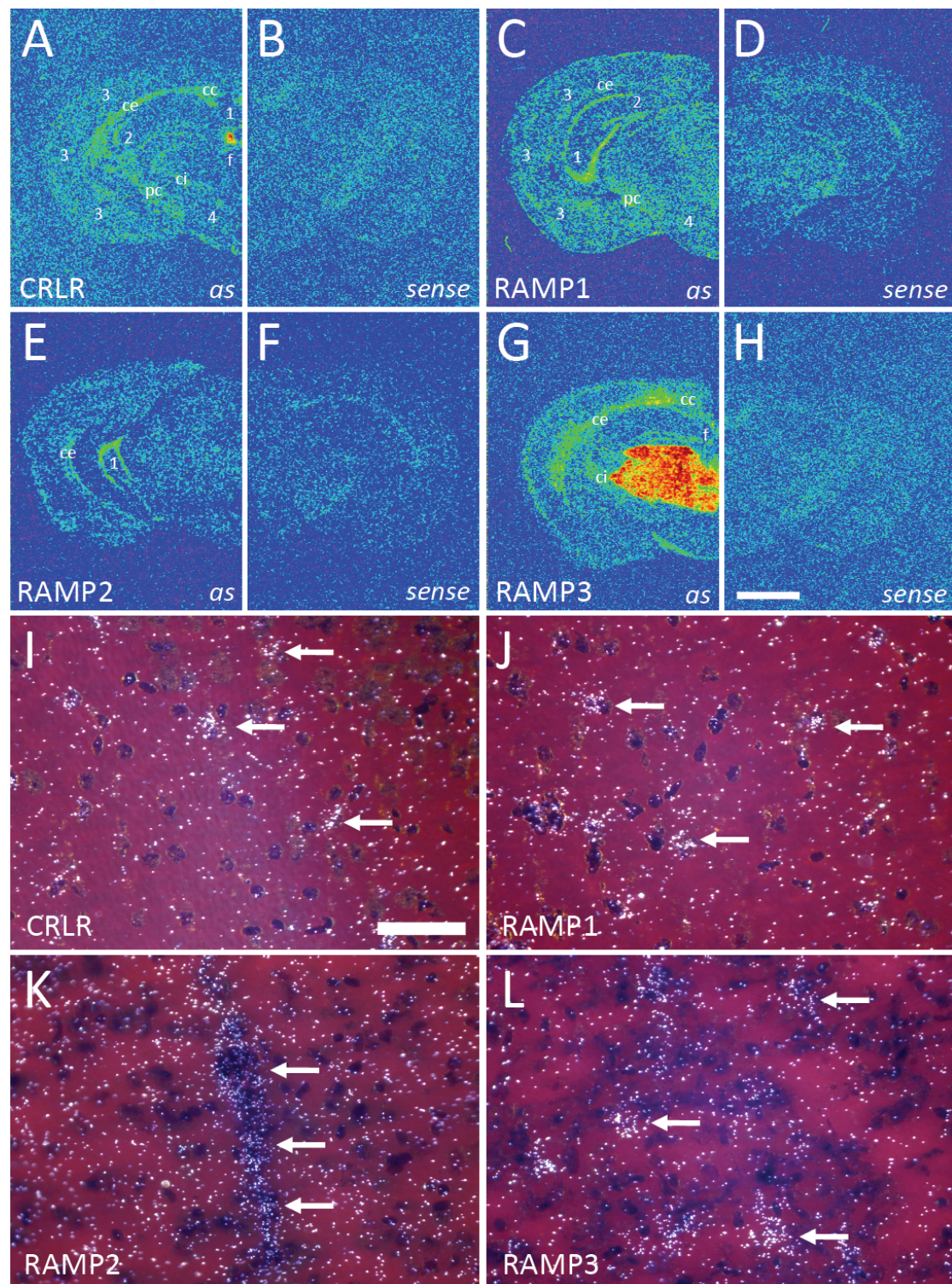


Abb. 3.1.4.2: Etablierung der Ribosonden für CRLR und RAMP1-3 im Wildtyp (P120). A-H: OD-Falschfarbengraphik von Autoradiogrammen. A, C, E, G zeigen optisch dichte Signale der *antisense* (as)-Sonden, B, D, F, H: mit der *sense*-Sonde hybridisierte Folgeschnitte derselben Hemisphäre, die zum besseren Vergleich gespiegelt und der as-Sonde gegenübergestellt wurden. 1-4 indizieren positive Areale, cc: corpus callosum, ce: capsula externa, ci: capsula interna, f: fornix, pc: pedunculi cerebellaris. I-L: Dunkelfeldaufnahmen des nachfolgenden Gewebeatutoradiogramms der as-Sonden, in denen sich das radioaktive Signal als Anhäufung weißer Silberkörnchen darstellt. CRLR (I) und RAMP1 (J) zeigten vereinzelte positive Zellen im Kortex (siehe Pfeile) und RAMP2 (K) über den Endothelzellen der Blutgefäße. RAMP3 zeigte neben dem Thalamus auch deutlich positive Zellen im Striatum (L). Balken in (H) entspricht 200 μ m und gilt auch für A-G, Balken in (I) entspricht 50 μ m und gilt auch für J-L.

3.1.4.3 Expression von CRLR und RAMP1-3 in ALS-relevanten Hirnarealen und Zelltypen

Wie hier beispielhaft für den Ncl. hypoglossus gezeigt (Abb. 3.1.4.3.), ergab die *in situ*-Hybridisierung verschiedener somatomotorischer Kernareale von Wildtypen und SOD1-transgenen Tieren nur für CRLR (A+B) ein Einzelzellsignal, das vermutlich über Gliazellen lokalisierte. Für RAMP1-3 (C-H) waren jedoch selbst bei langen Expositionszeiten im Dunkelfeld (B, D, F, H) keine Einzelzellsignale sichtbar, die sich im Hellfeld (A, C, E, G) entweder den Motoneuronen (große helle Zellkerne) oder Gliazellen (kleine, dunkle Zellkerne) hätten zuordnen lassen. Ebenfalls nicht zu beobachten war eine Veränderung der Signalstärke im SOD1-transgenen Tier (I-P), obwohl dies durch die Aktivierung der Astrozyten zu erwarten gewesen wäre. Aufgrund wesentlich stärkerer Signale in anderen Regionen des Gehirnschnittes, z.B. im benachbarten Ncl. dorsalis nervi vagii bei CRLR und RAMP3 (nicht gezeigt) ist allerdings fraglich, ob es sich bei den wenigen potenziell positiven Zellen für z.B. den CRLR überhaupt um Signale und nicht etwa nur um durch die lange Expositionzeit entstandenen Hintergrund handelte. Entsprechend blieb unklar, ob Motoneurone und Astrozyten – zumindest im Hirnstamm – keine Expression dieser Proteine zeigten oder die Expressionslevel bzw. die Sensitivität der verwendeten Ribosonden zu gering waren, um ein eindeutiges Signal zu erhalten.

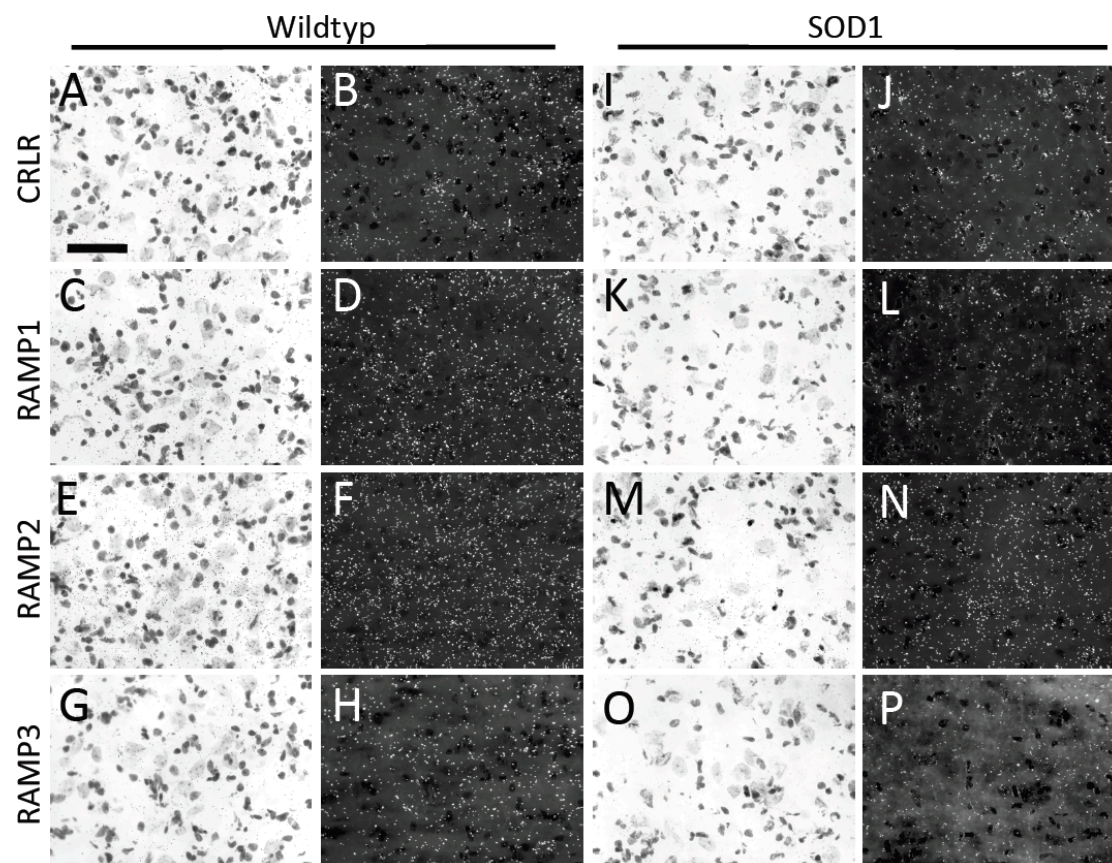


Abb. 3.1.4.3. (umseitig): CRLR und RAMP1-3-Expression in somatomotorischen Arealen. Gewebeautoradiogramm des Ncl. hypoglossus im Wildtyp (A-H) und SOD1-transgenen Tier (I-P) an P120 (Endstadium). Im Hellfeld (jeweils linke Spalte) sind die großen, schwach gefärbten Zellkerne der Motoneuronen und die kleinen, dunklen Zellkerne der Gliazellen zu sehen, im Dunkelfeld (jeweils rechte Spalte) die Silberkorn-Signale der jeweiligen radioaktiv-markierten Ribosonde. Außer für CRLR (A und B sowie I und J) waren keine eindeutigen Einzelzell-Signale auszumachen. Balken in (A) entspricht 50 μ m und gilt auch für B-P.

Zur Klärung dieser Frage wurde die mRNA von durch Lasermikrodissektion extrahierten Motoneuronen und Primärkulturen kortikaler Astrozyten von Wildtypmäusen isoliert und mittels PCR, die sensitiver ist als eine *in situ*-Hybridisierung, auf ihren Gehalt an CRLR und RAMP1-3 untersucht (siehe Abb. 3.1.4.4.). Die aus dem Ncl. spinalis nervi trigemini (V) und dem Ncl. facialis (VII) isolierten Motoneurone zeigten ein starkes Signal für den spezifischen Marker VACHT (vesikulärer Acetylcholintransporter), waren jedoch für keine der Rezeptorkomponenten positiv. Die aus Primärkulturen gewonnen Astrozyten zeigten neben dem spezifischen Marker GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) auch eine leichte Verunreinigung mit dem Mikroglia marker Csf1-R (*colony stimulating factor 1-Rezeptor*), so dass nicht endgültig davon ausgegangen werden konnte, dass die für die Rezeptorkomponenten stammenden Signale ausschließlich aus Astrozyten stammten.

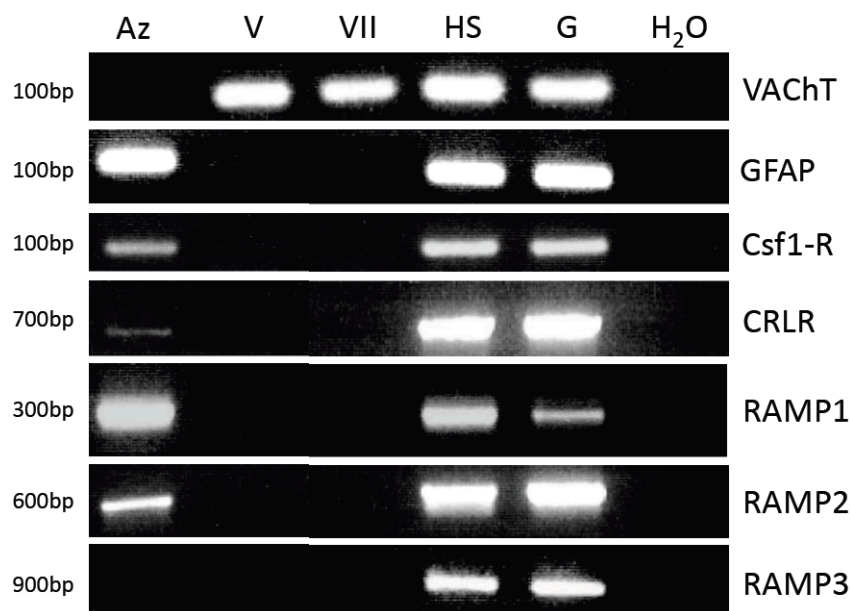


Abb. 3.1.4.4.: CRLR- und RAMP1-3 mRNA-Expression in ALS-relevanten Zelltypen. Az: kortikale Astrozyten aus Primärkultur, V: Motoneuronen des Ncl. motorius nervi trigemini, VII: Motoneuronen des Ncl. facialis, beide isoliert durch Laser-Mikrodissektion. HS: Hirnstamm, G: Gesamtgehirn (beide mediale Sagittalschnitte). VACHT: vesiculärer Acetylcholintransporter (Motoneuronenmarker), GFAP: *glial fibrillary acidic protein* (Astrozytenmarker), Csf1-R: *Colony-stimulating factor 1-Rezeptor* (Mikroglia marker), CRLR: *calcitonin receptor-like receptor*, RAMP1: *receptor activity-modifying protein*. bp: Basenpaare.

Zumindest die Signale für RAMP1 und RAMP2 waren bei gleicher Menge an eingesetzter cDNA deutlich stärker als diejenigen des MikrogliaMarkers, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass diese Komponenten auch von Astrozyten exprimiert wurden. RAMP3 war auch in Astrozyten nicht exprimiert. Die Positivkontrollen aus Kryo-Sagittalschnitten des ganzen Gehirns (G) bzw. des Hirnstamms (HS) zeigten für alle verwendeten Primer eine deutliche Bande.

Die Ergebnisse von Immunhistochemie, *in situ*-Hybridisierung und PCR zeigten, dass Astrozyten sowohl CRLR also auch RAMP1 und damit die für die Bildung des CGRP-Rezeptors notwendigen Komponenten exprimieren. Dafür spricht auch eine während der Untersuchung der CGRP-positiven Vakuolen (siehe 3.1.2) gemachte Beobachtung, dass Astrozyten im Endstadium eine Immunoreaktivität (IR) für CGRP aufwiesen (siehe Abb. 3.1.4.5.). Diese fiel im Vergleich zur CGRP-IR der Vakuolen und den Somata der Motoneurone zwar relativ schwach aus, doch könnte gerade dies ein Hinweis darauf sein, dass Astrozyten, die selbst kein CGRP exprimieren, im SOD1-transgenen Tier den Rezeptorkomplex mit gebundenem CGRP internalisieren. Astrozyten im Wildtyp gleichen Alters sowie SOD1-transgener Tiere früherer Stadien waren eindeutig CGRP-negativ.

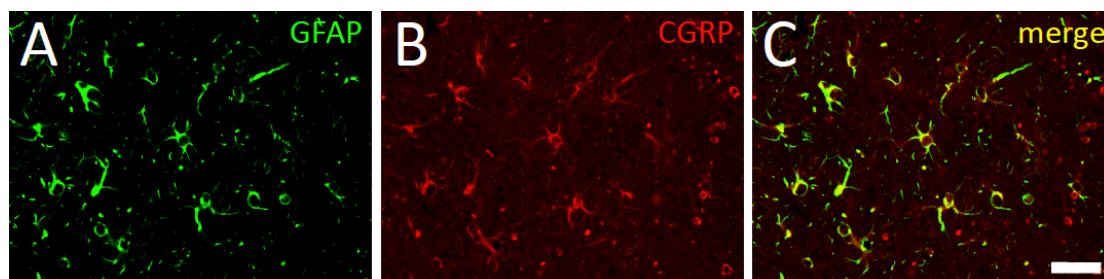


Abb. 3.1.4.5.: CGRP-Immunreaktivität in Astrozyten im Endstadium SOD1-transgener Mäuse. Doppelfluoreszenz des Astrozytenmarkers GFAP mit CGRP im Hypothalamus eines SO1-transgenen Tiers im Endstadium. Die Zahl der CGRP-positiven Vakuolen hat deutlich abgenommen, statt dessen zeigten die Astrozyten eine leichte CGRP-Immunoreaktivität. Balken in (C) entspricht 20 µm.

Es wäre also denkbar, dass durch die CGRP-positiven Vakuolen oder durch aktive Sekretion durch die (geschädigten) Motoneuronen CGRP freigesetzt wird, die Aktivierung der Astrozyten (und Mikroglia) beeinflusst und damit auch eine Rolle im Krankheitsverlauf der ALS spielt. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde eine RAMP1-Deletion in das SOD1-transgene Mausmodell eingekreuzt und somit der CGRP-Signalweg in der ALS-Pathogenese unterbunden (siehe 3.1.6.).

3.1.5 Etablierung von Testverfahren für Griffstärke der Vorderpfote und die Zungenmotorik und Untersuchung von Geschlechtsunterschieden im Krankheitsverlauf der ALS

Um festzustellen, ob sich die beobachteten histopathologischen Veränderungen im Gehirn (siehe 3.1.2.) bereits ähnlich früh auf motorische Fähigkeiten der Tiere auswirken, sollten zunächst zwei neue Testverfahren etabliert werden, mit denen sich der Verlauf der ALS-Symptomatik genauer erfassen lässt. Dabei handelte es sich zum einen um die Messung der Maximalkraft der Vorderpfote, mit dem wie beim PaGE (*paw grip endurance*)-Test zwar auch Motoneuronen des Rückenmarks auf ihre Funktion überprüft werden, wobei mit einem Test der Maximalkraft jedoch eine andere Modalität erfasst wird als die beim PaGE entscheidende Kraftausdauer. Zum anderen handelte es sich um ein Testverfahren, das mit der Leckgeschwindigkeit der Zunge die Funktion craniell lokalisierter Motoneurone, in diesem Fall des Ncl. hypoglossus, abgreift. Zur Etablierung dieser Verfahren wurden je mindestens 15 männliche und weibliche Wildtypen (WT m, n = 22, WT w, n = 23) und SOD1-transgene Mäuse (TG m, n = 17, TG w, n = 15) wöchentlich sowohl der beiden herkömmlichen Messungen des Körpergewichts und des PaGE-Tests sowie den beiden neuen Testverfahren unterzogen. Der Vergleich von männlichen und weiblichen Tieren adressierte dabei die Frage, ob im Hinblick auf geplante Einkreuzungen von *Knock-Out*-Stämmen in das SOD1-Mausmodell die Geschlechter ohne eine Verfälschung der Statistik gemischt und somit die Anzahl zur Durchführung dieser Versuche benötigte Tierzahlen deutlich reduziert werden konnte.

3.1.5.1 Definition der Schwellenwerte von Griffstärke und Leckfrequenz

Während der Schwellenwert für die Entwicklung des Körpergewichts (Wendepunkt zwischen wachstumsbedingter Gewichtszunahme und krankheitsbedingter Gewichtsabnahme) sowie des PaGE-Tests (Beginn des dauerhaften Nicht-Erreichens des Sollwertes von 2 min) in der Literatur etabliert sind, wurden vergleichbare Schwellenwerte für die neuen Verfahren erst mit dieser Arbeit definiert. Dazu erfolgte zunächst die isolierte Betrachtung der Wildtypen beider Geschlechter. Im Griffstärke-Test zeigten sowohl Männchen als auch Weibchen eine sich über die Zeit nicht verändernde Maximalkraft von durchschnittlich $90,1 \pm 11,9$ g (Männchen) bzw. $82,7 \pm 12,9$ g (Weibchen). Als eine Definition des Symptomstarts bei SOD1-transgenen Tieren käme der Mittelwert abzüglich der doppelten Standardabweichung, also 66,3 g für Männchen und 56,9 g für Weibchen in Frage. In einer graphischen Darstellung der Einzeltiere (Abb. 3.1.5.1.) wird deutlich, dass Männchen (A) nie und Weibchen (B) nie dauerhaft unter einen Wert von 60 g fallen. Entsprechend wurde hier unabhängig des Geschlechts

der Beginn einer dauerhafte Verringerung der maximalen Zugkraft auf < 60 g als Symptomstart für den Griffstärketest definiert.

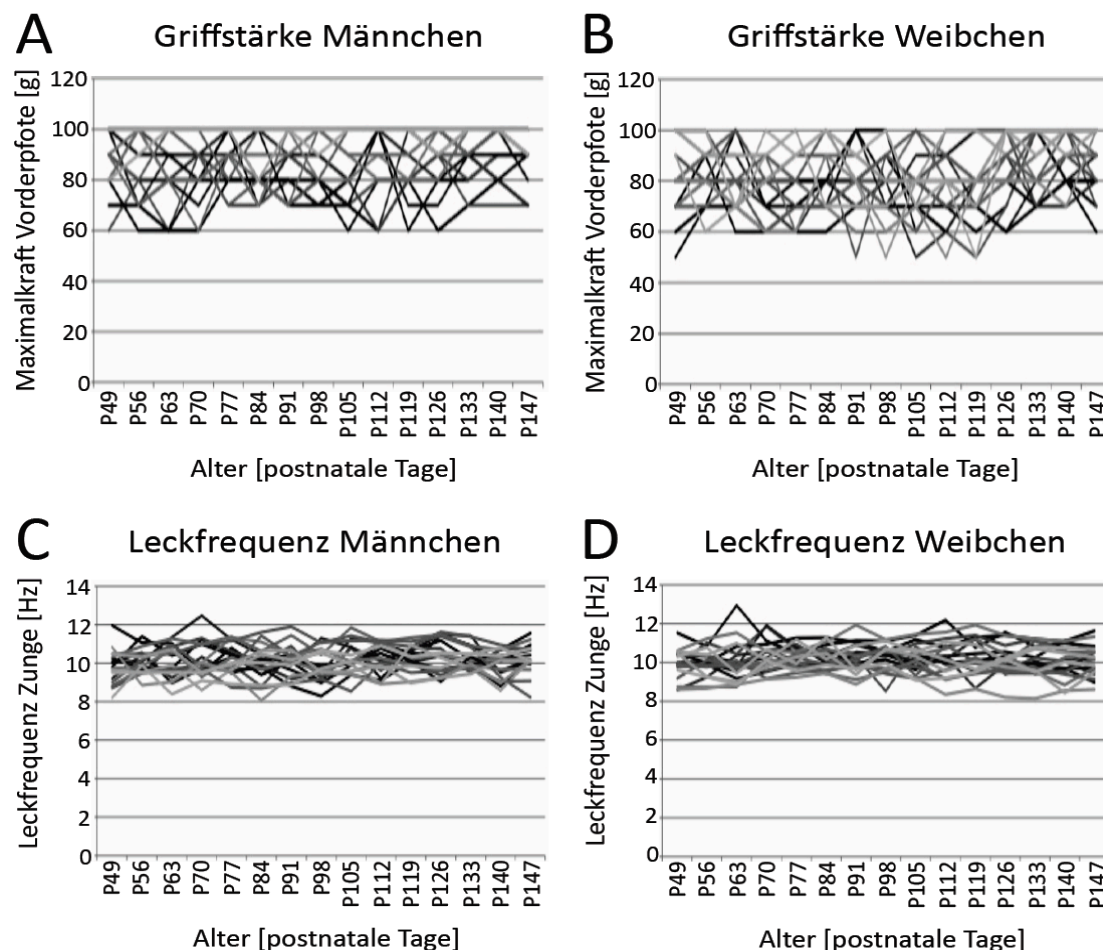


Abb. 3.1.5.1.: Zeitverlauf von Griffstärke- und Lecktest im Wildtyp. Einzelabtrag aller gemessenen Tiere getrennt nach Geschlecht. (A) Griffstärke der Männchen, (B) Griffstärke der Weibchen. Unabhängig vom Geschlecht treten keine Veränderungen im Zeitverlauf auf und kein Tier zeigte dauerhaft eine Maximalkraft unter 60g. (C) Leckfrequenz der Männchen, (D) Leckfrequenz der Weibchen. Unabhängig vom Geschlecht treten keine Veränderungen im Zeitverlauf auf und kein Tier zeigte dauerhaft eine Leckfrequenz unter 8,5 Hz.

Auch bei der Leckfrequenz war über den Untersuchungszeitraum hinweg im Wildtyp keinerlei altersbedingte Veränderung zu beobachten und Männchen wie Weibchen zeigten eine durchschnittliche Leckfrequenz von $10,1 \pm 0,8$ Hz. Der Abzug der doppelten Standardabweichung vom Mittelwert ergäbe einen Schwellenwert von 8,5 Hz und die graphische Übersicht über die individuelle Entwicklung (Abb 3.1.5.1.) zeigt, dass weder Männchen (C) noch Weibchen (D) diesen Wert dauerhaft unterschritten. Entsprechend wurde für SOD1-transgene Tiere im Lecktest der Beginn einer dauerhaften Unterschreitung von 8,5 Hz als Symptomstart definiert.

3.1.5.2 Geschlechtsunterschiede im Krankheitsverlauf der ALS

Bezüglich der Überlebensrate nach Kaplan-Meyer (Abb. 3.1.5.2.) traten mit 135 Tagen bei den Männchen und 136,5 Tagen bei den Weibchen keine Unterschiede zwischen den Geschlechtern auf. Bei der relativen Entwicklung des Körpergewichts (Abb. 3.1.5.3. A) hingegen war im Endstadium der Erkrankung ein signifikanter Unterschied ($p < 0,01$) zu beobachten, wobei die Männchen mit $85,2 \pm 9,5\%$ des Ausgangsgewichts (P49) deutlicher an Gewicht verloren als die Weibchen mit $95,5 \pm 11,0\%$. Außerdem zeigten SOD1-transgene Männchen im Vorfeld einen geringeren Gewichtszuwachs und unterschieden sich ab P91 signifikant von nicht-transgenen, männlichen Kontrolltieren, während sich SOD1-transgene Weibchen bis zu P112 nicht von ihren nicht-transgenen Geschwistertieren unterschieden. Bei einer Angleichung der Zeitverläufe auf den individuellen Symptomstart des Gewichtsverlusts (Abb. 3.1.5.3. B), zeigte sich mit durchschnittlich $P95,9 \pm 11,0\%$ bei den Männchen und $P103,3 \pm 10,1\%$ bei den Weibchen kein Unterschied zwischen den Geschlechtern. Auch der gesamte Verlauf der relativen Gewichtsentwicklung ergab keine signifikanten Unterschiede, obwohl sich die Männchen stets 5-10% unter den Weibchen bewegten.

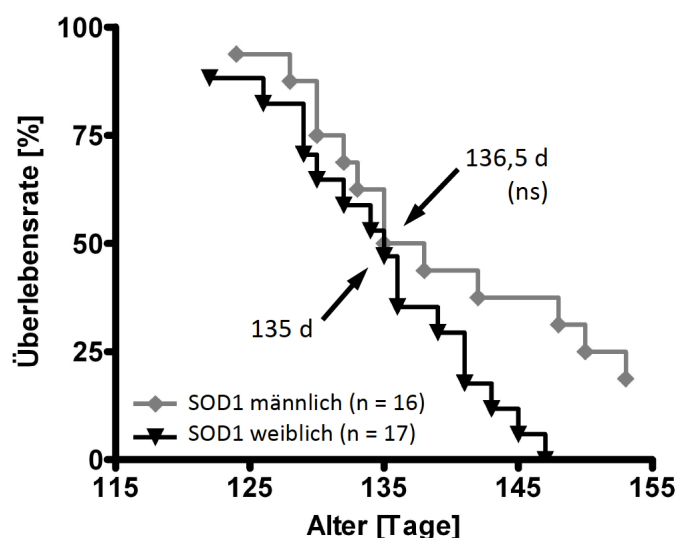


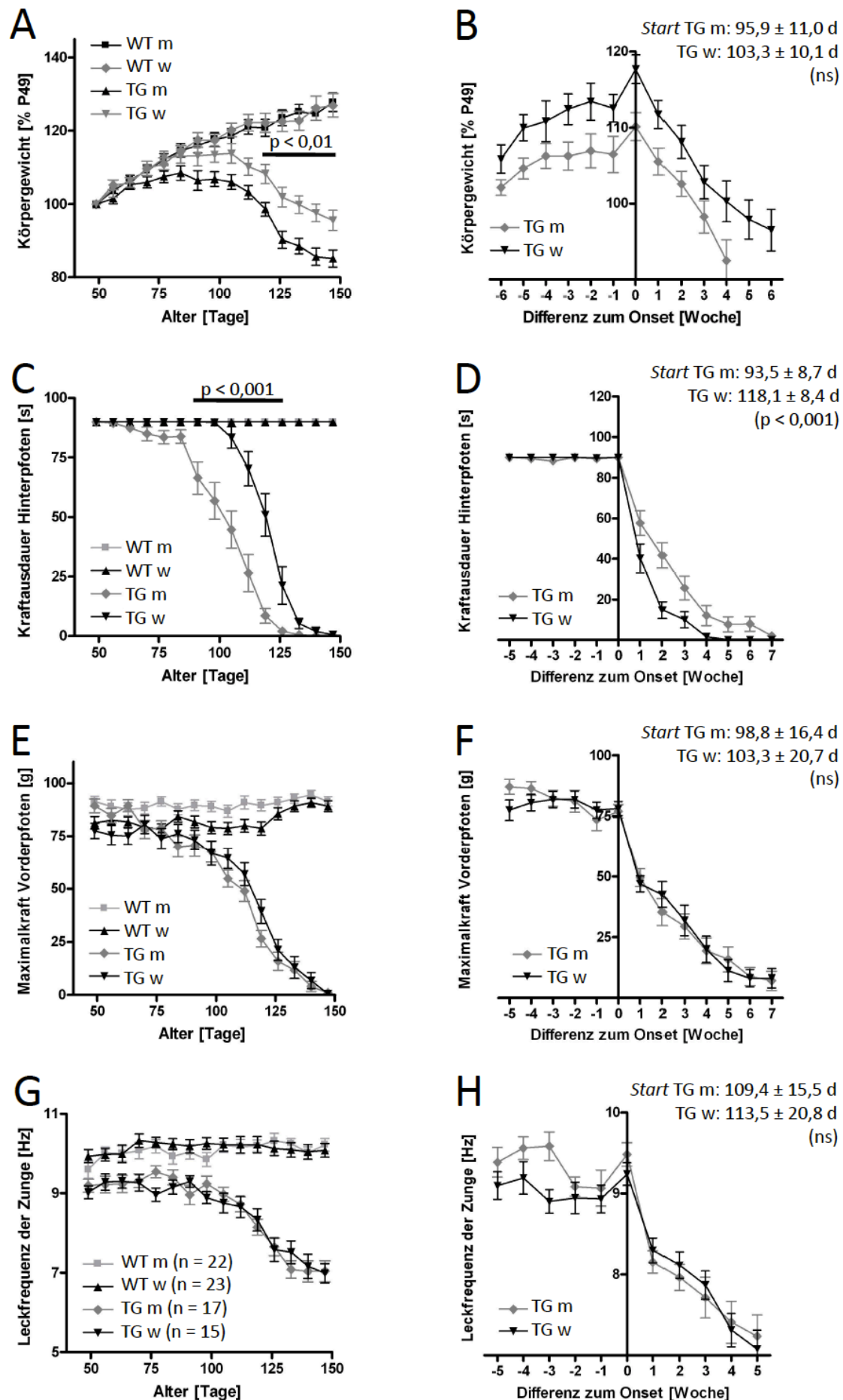
Abb. 3.1.5.2.: Überlebensrate von weiblichen und männlichen SOD1-transgenen Tieren. Überlebensrate nach Kaplan-Meyer. Eingezeichnet ist die mittlere Überlebensrate (50%) in Tagen (d), ns: nicht signifikant.

Ein ähnliches Bild ergab sich beim PaGE-Test (Abb. 3.1.5.3. C), wo SOD1-transgene Männchen sich ebenfalls ab P90 von ihren nicht-transgenen Geschwistern unterschieden, während SOD1-transgene Weibchen erst ab P112 einen signifikanten Unterschied zu nicht-transgenen Kontrolltieren aufwiesen. Entsprechend ergab sich auch innerhalb der SOD1-transgenen Tiere

von P90 bis P126 ein signifikanter Unterschied zwischen Männchen und Weibchen ($p < 0,001$) und der durchschnittliche individuelle Symptomstart der Männchen lag mit $P93,5 \pm 8,7$ deutlich vor dem individuellen Symptomstart der Weibchen ($P118,1 \pm 8,4$; $p < 0,001$; Abb. 3.1.5.3. D). Bei einer Angleichung des individuellen Symptomstarts waren im anschließenden Zeitverlauf der PaGE-Werte keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den Geschlechtern mehr zu beobachten. Bei dem Griffstärketest (Abb. 3.1.5.3. E) wiesen die SOD1-transgenen Männchen schon an P84 einen signifikanten Unterschied zu den nicht-transgenen Kontrolltieren auf, während SOD1-transgene Weibchen sich wie bei Gewichtsentwicklung und PaGE erst an P112 von den Kontrolltieren unterschieden. Der individuelle Symptomstart zeigte mit $P98,8 \pm 16,4$ bei den Männchen und $P103,3 \pm 20,7$ bei den Weibchen jedoch keinen Unterschied zwischen den Geschlechtern. Auch im Zeitverlauf der Symptomentwicklung waren weder in Abhängigkeit vom Alter (Abb. 3.1.5.3. E) noch nach Angleichung des individuellen Symptomstarts (F) Unterschiede zwischen den Geschlechtern zu beobachten. Beim Lecktest (Abb. 3.1.5.3. G) fiel auf, dass sowohl weibliche als auch männliche SOD1-transgene Tiere von Beginn an im Mittel knapp 1 Hz unter der durchschnittlichen Leckfrequenz der Kontrolltiere (WT) lagen (P49-P84: WT: $10,0 \pm 0,7$ Hz; SOD1: $9,2 \pm 0,5$ Hz), wobei dieser Unterschied mit Ausnahme einiger schwach-signifikanter Werte innerhalb der Weibchen (siehe Tabelle Anhang 5.2.3.) kein Signifikanzniveau erreichte. Deutlich signifikante Unterschiede zu den Kontrolltieren ergaben sich für beide Geschlechter ab P90, obwohl die Schwelle des Symptomstarts sowohl bei den transgenen Männchen als auch den Weibchen erstmals an P119 unterschritten wurde. Der individuelle Symptomstart zeigte mit $P109,4 \pm 15,5$ bei den Männchen und $P113,5 \pm 20,8$ bei den Weibchen keinen signifikanten Unterschied und auch im zeitlichen Verlauf der Symptomatik war kein Unterschied zwischen den Geschlechtern festzustellen (siehe Abb. 3.1.5.3. G und H).

Festzuhalten ist also, dass Männchen zwar eine etwas früher einsetzende Symptomentwicklung. Im weiteren Zeitverlauf der Symptomatik waren jedoch keinerlei Unterschiede mehr zu beobachten, so dass bei einer Angleichung des individuellen Symptomstarts für die nachfolgenden Einkreuzungsversuche keine statistischen Einwände gegen die Verwendung von Tieren beider Geschlechter bestanden. Außerdem lag der Beginn der Symptomatik der im Lecktest erfassten craniellen Motoneuronen mit ca. P110 leicht hinter dem Beginn der spinalen Symptomatik an ca. P95-100.

Abb 3.1.5.3. (umseitig): Zeitverlauf der Symptomentwicklung von männlichen und weiblichen SOD1-transgenen Tieren. WT: Wildtyp, TG: SOD1-transgen, m: männlich, w: weiblich. Links: alle gemessenen Gruppen im Zeitverlauf. Rechts: Vergleich der SOD1-transgenen Tiere beider Geschlechter im Zeitverlauf nach Angleichung des individuellen Symptomstarts. Angaben unter „Start“ bezeichnen den durchschnittlichen Symptomstart (Nullpunkt) des jeweiligen Geschlechts und eventuell bestehende signifikante Unterschiede, ns: nicht signifikant.



3.1.6 Effekte einer RAMP1-Deletion auf den Krankheitsverlauf der ALS

Die Deletion von α CGRP im SOD1-Mausmodell hatte zwar keinen Effekt auf den Krankheitsverlauf (siehe 3.1.1.), doch ist nicht ausgeschlossen, dass β CGRP alleine einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf ausübt bzw. sich die beiden Isoformen bei Verlust der einen gegenseitig in ihrer Funktion ersetzen. Da ein β CGRP-Knockout bisher nicht zu Verfügung stand, um durch Kombination mit dem α CGRP-Knockout-Stamm eine komplette CGRP-Deletion zu generieren, wurde hier auf eine Deletion der CGRP-spezifischen Rezeptorkomponente RAMP1 zurückgegriffen, um den CGRP-Signalweg zu unterbinden.

Da bei einem eventuellen, protektiven Effekt von CGRP mit einem früheren Krankheitsbeginn der SOD1-transgenen Tiere mit RAMP1-Deletion zu rechnen war, wurde mit den wöchentlichen Untersuchungen nicht an P49, sondern bereits an P35 begonnen. Untersucht wurden neben den Kontrolltieren (WT:WT, $n = 10$) RAMP1-defiziente Tiere ohne SOD1-Transgen (WT:KO, $n = 15$), reine SOD1-transgene Tiere (TG:WT, $n = 22$) sowie SOD1-transgene Tiere mit RAMP1-Deletion (TG:KO, $n = 17$).

3.1.6.1 Auswirkungen auf den Verlauf der klinischen Symptomatik

Die Überlebensrate der SOD1-transgenen Tiere mit RAMP1-Deletion war mit durchschnittlich 142 Tagen etwas höher als diejenige der ohne RAMP1-Deletion mit 137 Tagen (siehe Abb. 3.1.6.1.), jedoch erreichte dieser Unterschied kein Signifikanzniveau.

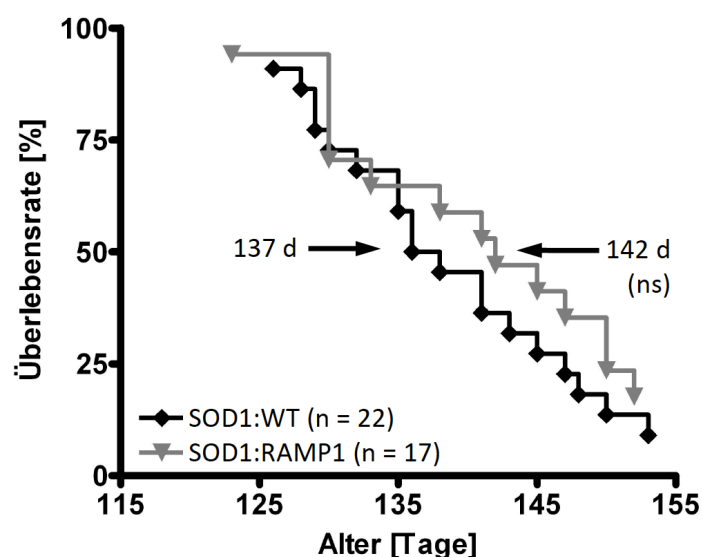


Abb. 3.1.6.1.: Überlebensrate von RAMP1-kompetenten und RAMP1-defizienten SOD1-transgenen Tieren. Überlebensrate nach Kaplan-Meier. Eingezeichnet ist die mittlere Überlebensrate (50%) in Tagen (d), ns: nicht signifikant. SOD1: SOD1-transgen, WT: Wildtyp (RAMP1-kompetent), RAMP1: RAMP1-defizient.

Bei der Dokumentation der Symptomentwicklung (Abb. 3.1.6.2.) fiel zunächst auf, dass die Standardabweichung vor allem bei der Entwicklung des Körpergewichts, des Kraftausdauer-tests (PaGE) und der Test der Maximalkraft aufgrund der Verwendung von Tieren beider Geschlechter mit bis zu 20% des Mittelwertes relativ hoch war, die statistische Aussagekraft der Messungen blieb aufgrund der ausgewogenen Verteilung der Geschlechter innerhalb aller Gruppen aber gegeben.

Bei der relativen Entwicklung des Körpergewichts (Abb. 3.1.6.2.) war weder im zeitlichen Verlauf der Gesamtgruppe (A), noch nach Angleichung des individuellen Symptomstarts (B) ein Unterschied zwischen SOD1-transgenen Tieren mit und ohne RAMP1-Deletion zu beobachten. Entsprechend war auch der durchschnittliche Symptomstart der RAMP1-kompetenten Tiere mit $102,7 \pm 25,3$ Tagen (d) gegenüber dem der RAMP1-deletierten Tiere mit $98,4 \pm 12,0$ d nicht signifikant verändert.

Im PaGE-Test (Abb. 3.1.6.2. A) erreichten einige der RAMP1-deletierten SOD1-transgenen Tiere schon bei der ersten Messung an P35 den Sollwert von 2 min nicht, während bei RAMP1-kompetenten Tieren frühestens an P49 erste Defizite auftraten, die meist nur vorübergehend waren und die Tiere zu einem späteren Zeitpunkt die 2 min wieder erreichten, was bei den RAMP1-defizienten nicht auftrat. Einen ersten signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen ergab sich bereits an P49 ($p < 0,05$), der sich zunächst verstärkte ($p < 0,001$ an P54-77, $p < 0,01$ an P84). Im Zeitverlauf schienen die RAMP1-defizienten SOD1-Tiere zunächst in eine Plateauphase zu fallen, in der sich die Symptomatik über eine Zeitspanne von ca. 3 Wochen kaum verschlechterte, bevor ein ähnlich dramatischer Abfall der Kraftausdauer eintrat wie bei RAMP1-kompetenten SOD1-transgenen Tieren. Entsprechend war in der Endphase der Erkrankung von P98 an kein Unterschied zwischen RAMP1-defizienten und –kompetenten SOD1-Tieren mehr zu beobachten.

Eine Angleichung der individuellen Symptomstarts (Abb. 3.1.6.2. B) offenbarte allerdings, dass es sich sowohl bei der Plateauphase als auch der nachfolgenden Verschärfung des Krankheitsverlauf nur um ein durch die statistischen Schwankungen entstandenes Artefakt handelte, und die RAMP1-defizienten Tiere vielmehr einen kontinuierlich verlangsamten Krankheitsverlauf zeigten. Der durchschnittliche Symptomstart lag mit $56,5 \pm 30,4$ d deutlich unter demjenigen der RAMP1-kompetenten Geschwistertiere mit $92,0 \pm 20,0$ d ($p < 0,001$). Nachdem bei beiden Gruppen ein ähnlicher initialer Abfall der Kraftausdauer zu beobachten war, reduzierte sich dieser bei den RAMP1-defizienten Tieren im weiteren Zeitverlauf, so dass diese ab 3 Wochen nach Symptomstart eine deutlich bessere Kraftausdauer aufwiesen als die RAMP1-kompetenten Tiere ($p < 0,001$). Nach dem Symptombeginn zeigten die RAMP1-defizienten Tiere noch eine durchschnittliche Lebenserwartung von $85,7 \pm 26,5$ Tagen, während es bei RAMP1-kompetenten Tieren nur $46,9 \pm 22,3$ Tage waren ($p < 0,001$).

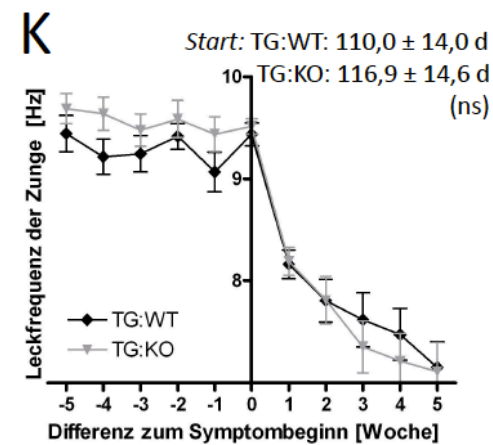
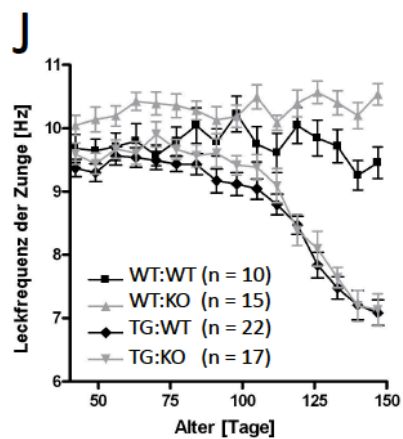
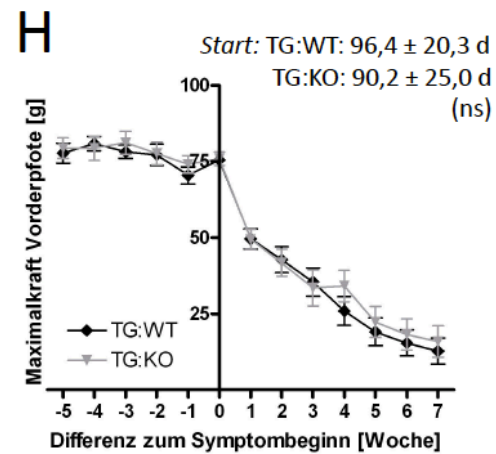
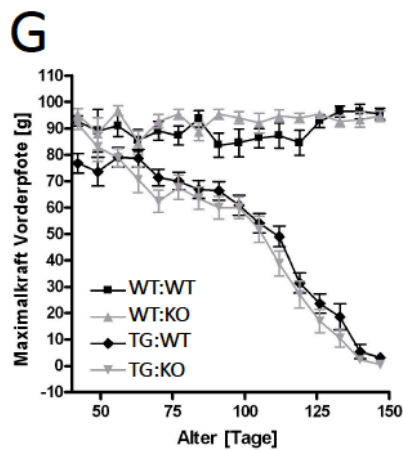
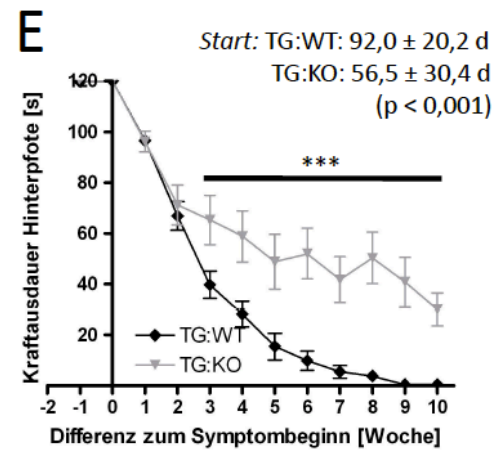
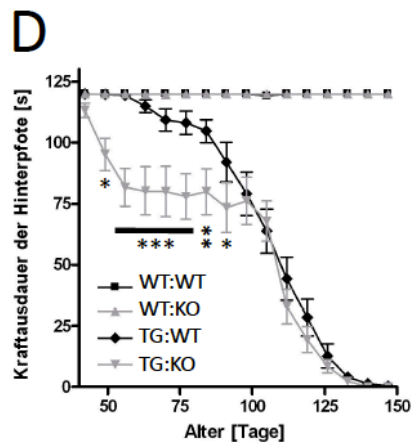
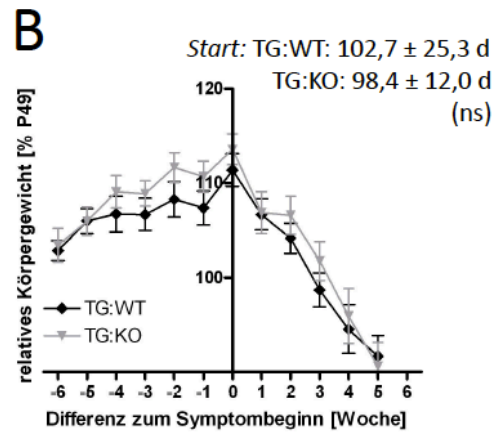
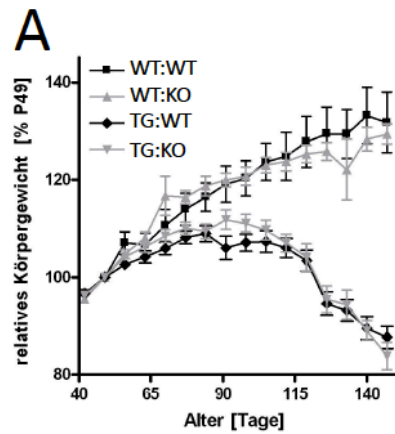


Abb. 3.1.6.2.: (umseitig): Zeitverlauf der Symptomentwicklung von RAMP1-kompetenten und RAMP1-defizienten SOD1-transgenen Tieren. WT: Wildtyp, TG: SOD1-transgen, KO: RAMP1-defizient. Links: alle gemessenen Gruppen im Zeitverlauf. Rechts: Vergleich der SOD1-transgenen Tiere mit und ohne RAMP1-Deletion im Zeitverlauf nach Angleichung der individuellen Symptomstarts. Angaben unter „Start“ bezeichnen den durchschnittlichen Symptomstart (Nullpunkt) des jeweiligen Genotyps und eventuell bestehende signifikante Unterschiede, ns: nicht signifikant, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Ebenfalls bemerkenswert ist die Beobachtung, dass bei SOD1-kompetenten Tieren Gewichtsverlust und der Symptomstart im PaGE-Test zeitgleich einsetzten (Start Gewicht $102,7 \pm 25,3$ d vs. PaGE $92,0 \pm 20,2$ d; ns), während die RAMP1-defizienten Tiere erst deutlich nach dem Auftreten der ersten Funktionverluste im PaGE an Gewicht verloren (Start Gewicht $98,4 \pm 12,0$ d vs. PaGE $56,4 \pm 30,4$ d; $p < 0,001$).

Im Gegensatz dazu fanden sich weder in der Maximalkraft der Vorderpfote (Abb. 3.1.6.2. G und H) noch in der Leckfrequenz (Abb. 3.1.6.2. J und K) signifikante Unterschiede zwischen RAMP1-defizienten und -kompetenten SOD1-transgenen Tieren, weder im Altersvergleich der Gruppen (G und J) noch nach Angleichung der individuellen Symptomstarts (H und K). Während bei RAMP1-kompetenten SOD1-transgenen Tieren die Symptomatik der Hinter- und Vorderpfote bzw. Kraftausdauer und Maximalkraft gleichzeitig ($P92,0 \pm 20,2$ vs. $P96,4 \pm 20,3$; ns) und die der Zunge nur wenig später auftrat ($P110,0 \pm 14,0$; $p < 0,05$), waren die Symptomstarts bei RAMP1-defizienten Tieren zeitlich deutlich versetzt: Defizite in der Kraftausdauer der Hinterpfote traten vor Defiziten in der Maximalkraft der Vorderpfote auf ($P56,5 \pm 30,4$ vs. $P90,2 \pm 25,0$; $p < 0,01$) und diese wiederum weit vor Defiziten in der Zungenmotorik ($P116,9 \pm 14,6$; $p < 0,001$).

3.1.6.2 Auswirkungen auf Neurodegeneration und Neuroinflammation

Zur Quantifizierung der histopathologischen Veränderungen wurden Gehirn und Rückenmark von je 4 Tieren jeden Genotyps in Abhängigkeit von ihrem Alter bzw. dem Status der Symptomatik im PaGE-Test mittels Immunhistochemie untersucht. Pro Tier und Areal wurden je 5 Werte für die Anzahl überlebender Motoneurone, die Aktivierung von Astroglia und Mikroglia sowie die Lymphozyteninfiltration erhoben (siehe Abb. 3.1.6.3.). Verglichen wurden dabei früh- bzw. spätsymptomatische SOD1-transgene Tiere, die seit zwei bzw. sechs Wochen eine Symptomatik im PaGE-Test zeigten (2x bzw. 6x). Die Gruppierung nach PaGE-Symptomatik diente dabei der Eliminierung der Varianz im Krankheitsbeginn einzelner Tiere. Da es vorkam, dass ein Tier nach einmaliger Unterschreitung des 2min-Schwellenwertes diesen in der nächsten Woche wieder erreichte, wurde erst eine zweifache Unterschreitung als

frühsymptomatisches Stadium definiert. Die sechswöchige Symptomatik wurde gewählt, da sich RAMP1-kompetente Tiere dort bereits im Endstadium der Erkrankung befanden, während RAMP1-defiziente Tiere aufgrund des langsameren Verlaufs noch einige Wochen länger lebten. Aufgrund des früheren Symptomstarts der RAMP1-defizienten Tiere (siehe oben) ergab sich bei symptomgleichen Tieren ein Altersunterschied von durchschnittlich 30 Tagen, woraus folgende Gruppen resultierten: TG:WT (2x/P90), TG:WT (6x/P120) vs. TG:KO (2x/P60), TG:KO (6x/P90) und TG:KO (P120). Interessant ist auch der Vergleich altersgleicher Tiere an P90, wo sich RAMP1-kompetente Tiere im früh- und RAMP1-defiziente Tiere bereits im spätsymptomatischen Stadium befinden, sowie an P120, wo beide Genotypen nach unterschiedlich langem Krankheitsverlauf das Endstadium erreichten.

Neurodegeneration

Zur Quantifizierung der Neurodegeneration und deren Vergleich zur klinischen Symptomatik wurden die Motoneurone des Ncl. hypoglossus (XII, steuert Zungenmotorik) und des lateralen Vorderhorns im lumbalen Rückenmark (innerviert u.a. Muskulatur der Hinterpfote) gezählt. Im Ncl. XII (siehe Abb. 3.1.6.3. B) zeigte sich bei einer zweiwöchigen PaGE-Symptomatik der SOD1-transgenen Tiere trotz einer tendenziell bereits verringerten Anzahl noch kein signifikanter Verlust der Motoneurone im Vergleich zum Wildtyp: $41,5 \pm 9,0$ vs. TG:KO (2x/P60): $38,7 \pm 12,2$ (ns) bzw. TG:WT (2x/P90): $31,9 \pm 6,5$ (ns). Die geringe Differenz zwischen TG:WT und TG:KO war in diesem Stadium ebenfalls nicht signifikant.

Im lumbalen Rückenmark (siehe Abb. 3.1.6.3. C) hingegen zeigten RAMP1-defiziente SOD1-Tiere bereits bei zweiwöchiger Symptomatik einen signifikanten Verlust an Motoneuronen (WT:KO $9,8 \pm 3,1$ vs. TG:KO (2x/P60): $5,6 \pm 2,2$; $p < 0,01$), während bei RAMP1-kompetenten Tieren noch kein signifikanter Verlust zu beobachten war (WT:WT $8,9 \pm 1,9$ vs. TG:WT (2x/P90): $7,1 \pm 1,9$; ns). Bei sechswöchiger PaGE-Symptomatik war bei RAMP1-defizienten Tieren kein zusätzlicher Verlust an Motoneuronen zu verzeichnen, während RAMP1-kompetente Tiere nach sechs Wochen deutlich weniger überlebende Neurone aufwiesen (TG:KO (6x/P90): $5,3 \pm 1,8$; TG:WT (6x/P120): $2,1 \pm 0,8$; $p < 0,01$). Bei Erreichen des Endstadiums an P120 waren auch bei RAMP1-defizienten Tieren nur noch wenige überlebende Neurone zu finden ($1,7 \pm 1,3$), so dass sie sich nicht mehr von den sich ebenfalls an P120 im Endstadium befindlichen RAMP1-kompetenten Tieren unterschieden.

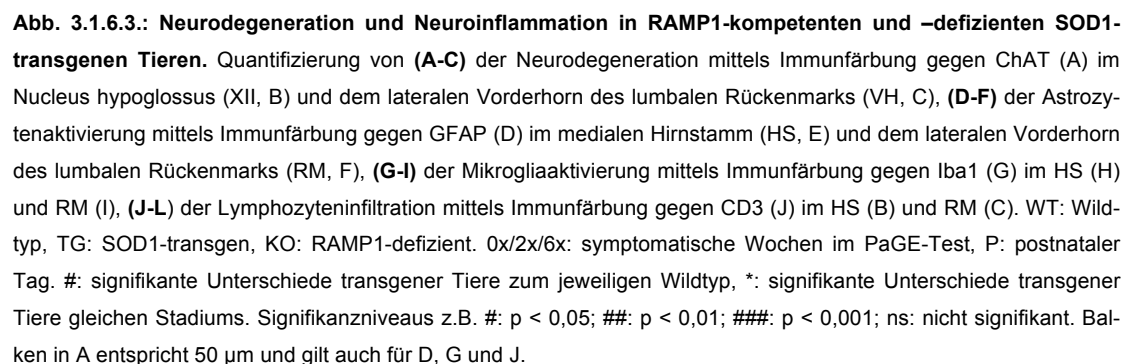
Sowohl im Fall des Ncl. hypoglossus (XII) als auch im lumbalen Rückenmark (RM) spiegelte der Überlebensstatus der Motoneurone beider Genotypen den klinischen Symptombefund wider, wo keine Unterschiede im Lecktest (vergleiche XII), bei den RAMP1-defizienten Tieren aber ein früherer Beginn mit anschließend langsamerem Verlauf im PaGE-Test (vergleiche RM) zu beobachten war.

Neuroinflammation

Während Mikroglia und Lymphozyten ebenso wie die Motoneurone als Einzelzellen gezählt wurden, gestaltete sich eine analoge algorithmenbasierte Auszählung bei Astrozyten aufgrund der vielen verbindenden Fortsätze schwierig, so dass statt Einzelzellen der Anteil GFAP-positiver Fläche an der gemessenen Gesamtfläche als Maß für die Astrozytenaktivierung verwendet wurde (siehe Abb. 3.1.6.3. D).

Im gesamten Krankheitsverlauf zeigten die SOD1-transgenen Tiere im medialen Hirnstamm (Schnittebene und Flächendefinition siehe 2.6.6.) eine kontinuierliche Zunahme der GFAP-positiven Fläche (siehe Abb. 3.1.6.3. E). Während dieser bei RAMP1-kompetenten Tieren bereits bei zweiwöchiger Symptomatik erhöht war (WT:WT $1,5 \pm 0,4\%$ vs. TG:WT (2x/P90): $8,4 \pm 4,0\%$; $p < 0,01$), zeigte sich bei RAMP1-defizienten Tieren zunächst nur ein tendenzieller Anstieg (WT:KO $2,3 \pm 1,5\%$ vs. TG:KO (2x/P60): $4,1 \pm 1,9\%$; ns; TG:KO (6x/P90): $6,1 \pm 2,5\%$; ns), der erst im Endstadium Signifikanzniveau gegenüber dem Wildtyp erreichte (TG:KO P120: $11,9 \pm 2,6\%$, $p < 0,001$). Entsprechend war bei RAMP1-defizienten Tieren im Vergleich zu RAMP1-kompetenten Tieren bei gleichem Symptomstatus eine deutlich schwächere Aktivierung der Astrozyten zu beobachten (2x: $p < 0,05$; 6x: $p < 0,001$). Im lumbalen Rückenmark (Abb. 3.1.6.3. F) hingegen zeigten RAMP1-defiziente Tiere bereits bei zweiwöchiger Symptomatik einen Anstieg der GFAP-positiven Fläche (WT:KO $8,0 \pm 3,8\%$ vs. TG:KO (2x/P60): $21,9 \pm 5,3\%$, $p < 0,01$), der sich im weiteren Verlauf nur noch gering steigerte (TG:KO (6x/P90): $22,2 \pm 7,5\%$; TG:KO (P120): $28,8 \pm 5,3\%$). Bei RAMP1-kompetenten Tieren hingegen war nach zweiwöchiger Symptomatik nur eine tendenzielle Erhöhung der Astrozytenaktivierung zu beobachten, die erst nach einer weiteren, deutlichen Zunahme der GFAP-positiven Fläche bei sechswöchiger Symptomatik Signifikanzniveau erreichte (WT:WT $9,7 \pm 2,4\%$ vs. TG:WT (2x/P90): $18,6 \pm 7,2$; ns, bzw. TG:WT (6x/P120): $37,6 \pm 10,6\%$; $p < 0,001$). Entsprechend war nach zweiwöchiger Symptomatik kein Unterschied zwischen RAMP1-defizienten und -kompetenten Tieren zu beobachten, nach sechswöchiger Symptomatik war die Astrozytenaktivierung in RAMP1-defizienten Tieren im Vergleich zu RAMP1-kompetenten Tieren wie im Hirnstamm deutlich reduziert ($p < 0,01$).

Ein ähnliches Bild wie bei den Astrozyten fand sich auch bezüglich der Mikroglia, vor allem im Hirnstamm (Abb. 3.1.6.3. H), wo bei RAMP1-defizienten Tieren erst spät ein deutlicher Anstieg der Zellzahl zu beobachten war (WT:KO $13,4 \pm 9,2$ vs. TG:KO (2x/P60): $17,5 \pm 11,7$; ns; TG:KO (6x/P90): $24,1 \pm 12,1$; ns; TG:KO (P120): $74,2 \pm 50,4$; $p < 0,001$). RAMP1-kompetente Tiere zeigten bereits nach zweiwöchiger Symptomatik einen tendenziellen Anstieg der Mikroglia, der jedoch ebenfalls erst im Endstadium Signifikanzniveau erreichte (WT:WT $13,0 \pm 5,3$ vs. TG:WT (2x/P90): $30,8 \pm 20,0$; ns; TG:WT (6x/P120): $89,6 \pm 20,8$; $p < 0,001$).



Folglich ergab sich bei zweiwöchiger Symptomatik kein signifikanter Unterschied zwischen RAMP1-kompetenten und -defizienten Tieren, nach sechswöchiger Symptomatik hingegen lag die Anzahl der Mikroglia bei RAMP1-defizienten Tieren deutlich unter der der RAMP1-kompetenten Tiere (TG:WT (6x/P120): $89,6 \pm 20,8$; TG:KO (6x/P90): $24,1 \pm 12,1$; $p < 0,001$). Im lumbalen Rückenmark (Abb. 3.1.6.3. I) zeigten die RAMP1-defizienten Tiere eine ab P90 signifikant erhöhte Anzahl an Mikroglia (WT:KO $13,8 \pm 6,0$ vs. TG:KO (2x/P60): $34,9 \pm 19,3$; ns; TG:KO (6x/P90): $72,6 \pm 20,7$; $p < 0,01$; TG:KO (P120): $69,6 \pm 67,6$; $p < 0,01$). Bei RAMP1-kompetenten Tieren hingegen kam zu keinem Stadium ein signifikanter Unterschied zum Wildtyp zustande, was sich – ebenso wie die hohe Standardabweichung bei TG:KO (P120) – dadurch erklären lässt, dass in den späten Stadien die Mikroglia bei den RAMP1-kompetenten und der Hälfte der RAMP1-defizienten Tiere bereits sehr stark degeneriert war und nur noch eine schwache Immunoreaktivität zeigte, die von dem auswertenden Algorithmus nicht erkannt wurde, der Schwellenwert aufgrund des nur marginalen Kontrastunterschiedes zum Hintergrund jedoch nicht angepasst werden konnte. Entsprechend kann auch der signifikante Unterschied zwischen RAMP1-defizienten und RAMP1-kompetenten Tieren bei sechswöchiger Symptomatik nicht eindeutig interpretiert werden.

Bei der Infiltration CD3-positiver Lymphozyten in den medialen Hirnstamm (Abb. 3.1.6.3. K) waren bei RAMP1-defizienten Tieren zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen SOD1-transgenen und Wildtyp-Tieren zu beobachten, obwohl eine tendenzielle Zunahme der Zellzahl vorlag (WT:KO $1,0 \pm 0,7$ vs. TG:KO (2x/P60): $2,7 \pm 2,1$; ns; TG:KO (6x/P90): $5,4 \pm 5,4$; ns; TG:KO (P120): $6,3 \pm 2,8$; ns). Bei den RAMP1-kompetenten Tieren hingegen zeigte sich bereits nach zweiwöchiger Symptomatik ein stärkerer Anstieg der Lymphozytenzahl, der später ein deutliches Signifikanzniveau erreichte (WT:WT $1,4 \pm 1,0$ vs. TG:WT (2x/P90): $7,9 \pm 6,3$; ns; TG:WT (6x/P120): $21,1 \pm 9,1$; $p < 0,001$). Entsprechend zeigten RAMP1-kompetente Tiere zu allen Zeitpunkten eine deutlich höhere Lymphozytenaktivierung als RAMP1-defiziente Tiere (2x und 6x $p < 0,001$). Eine analoge Zählung im lumbalen Rückenmark (Abb. 3.1.6.3. L) ergab aufgrund der geringen Zahlen von 0-5 Zellen pro Schnitt keine statistisch aussagekräftigen Werte.

Abschließend ist also festzuhalten, dass RAMP1-defiziente Tiere eine geringere Aktivierung aller beteiligten Zelltypen und damit eine insgesamt schwächere Neuroinflammation aufwiesen als RAMP1-kompetente Tiere mit gleichem Symptomstatus. Bei einem Vergleich von Tieren gleichen Alters hingegen war lediglich die Lymphozyteninfiltration von RAMP1-defizienten Tieren signifikant geringer als diejenige bei RAMP1-kompetenten SOD1-transgenen Tieren (TG:WT (6x/P120): $21,1 \pm 9,1$; TG:KO (P120): $6,3 \pm 2,8$; $p < 0,001$). Es bestand also die Möglichkeit, dass diese zentral zu beobachtenden inflammatorischen Phänomene in RAMP1-kompetenten und -defizienten Tieren zeitgleich und damit unverändert

abließen, die Ursachen für die wesentlich früher eintretende Symptomatik im PaGE-Test und die frühere Degeneration der lumbalen Motoneuronen bei RAMP1-defizienten Tieren also nicht in der Neuroinflammation, sondern in der Peripherie, der Kopplung zwischen Motoneuron und Muskel, liegen konnten.

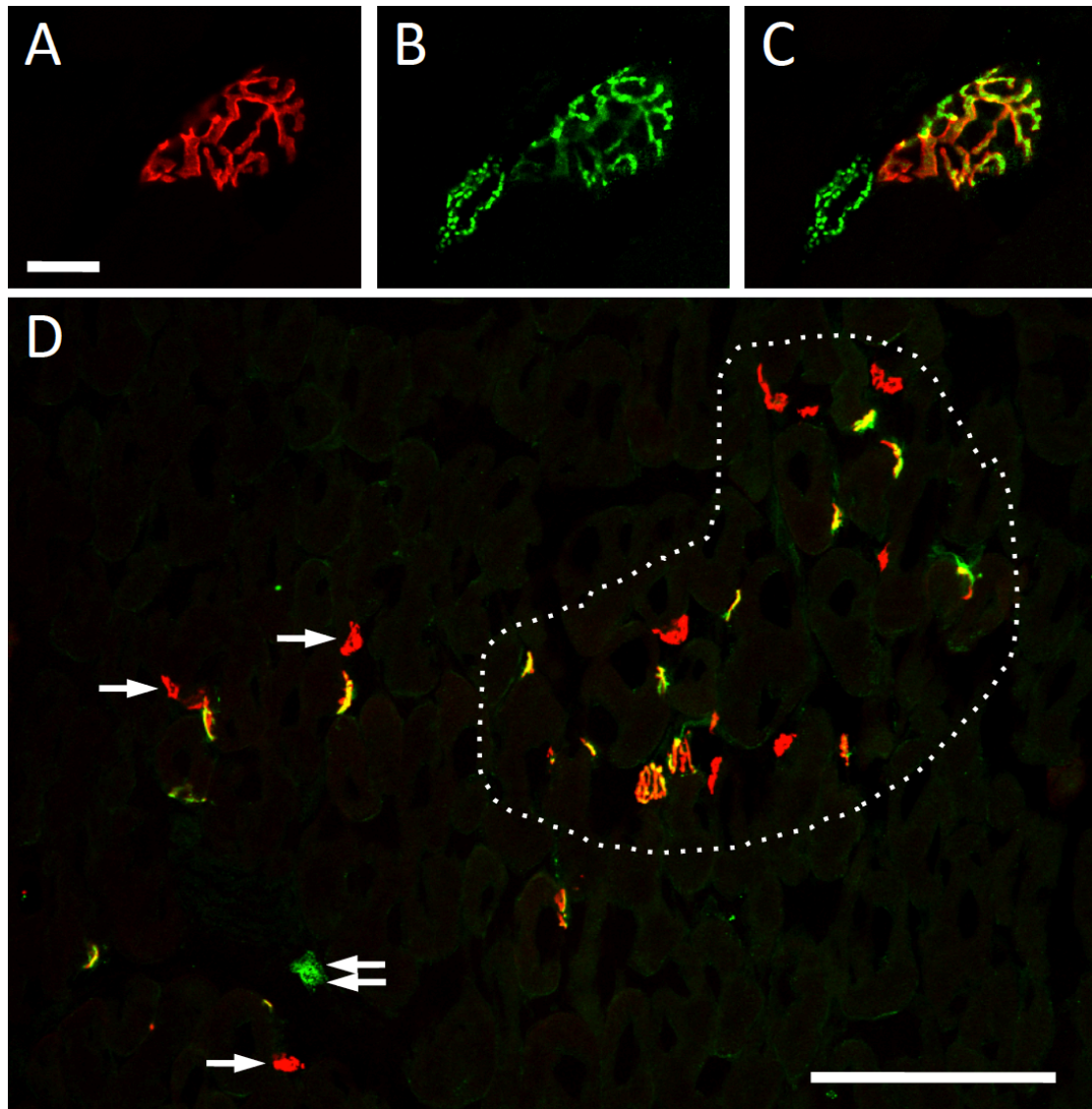


Abb. 3.1.6.4.: Doppelimmunfluoreszenz an neuromuskulären Endplatten. (A) Markierung der Acetylcholin-Rezeptoren der muskulären Seite mit α -Bungarotoxin (α Btx). (B) Markierung der innervierenden motorischen Nervenfasern mit vesikulärem Acetylcholintransporter (VACHT). (C) Kolokalisation von VACHT und α Btx. (D) Ausschnitt aus dem Musculus quadriceps eines SOD1-transgenen Tiers an P90. Einige α Btx-markierte Endplatten zeigten bereits keine VACHT-positiven Innervation mehr (Einfachpfeile). Außerdem fanden sich Abschnitte VACHT-positiver Nerven (Doppelpfeil). Die in der Fläche eingeschlossenen, benachbarten Endplatten bilden einen *Cluster*. Balken in (A) entspricht 10 μ m und gilt auch für (B) und (C), Balken in (D) entspricht 100 μ m.

3.1.6.3 Auswirkungen auf die Denervierung neuromuskulärer Endplatten

Um den Denervierungsstatus der Skelettmuskulatur auf eventuelle Unterschiede zwischen RAMP1-defizienten und –kompetenten Tieren zu untersuchen und mit den Befunden aus den klinischen Beobachtungen zu vergleichen, wurden je 5 Tiere eines Genotyps in Abhängigkeit von Alter bzw. Symptomstatus im PaGE miteinander verglichen. Dafür wurden pro Tier 10 Gewebeschnitte des M.triceps (Vorderlauf) und des M.quadriceps (Hinterlauf) mittels Immunhistochemie gefärbt. In der Doppelfluoreszenz (siehe Abb. 3.1.6.4.) wurde die muskuläre Seite der neuromuskulären Endplatten mittels α -Bungarotoxin gefärbt (α Btx, A), der innervierende motorische Nerv mit dem vesikulären Acetylcholintransporter (VACHT, B), die bei einer gesunden, vollständig innervierten Endplatte (EP) großflächige Kolo-kalisation zeigten (C). Kommt es im Zuge der ALS-Erkrankung bei SOD1-transgenen Tieren zur Denervierung einer EP, also dem Rückzug des Axons, bleibt die muskuläre Seite und damit das α Btx-Signal noch erhalten (siehe Pfeil in Abb. 3.1.6.4. D). Erst im Verlauf der Erkrankung werden auch EPs mit langfristig fehlender Innervation abgebaut, so dass sich die Anzahl der EPs auf dem Muskel verringert. Um diese zu quantifizieren, wurden *EP-Cluster*, d.h. Gruppen von eng nebeneinander liegenden EP definiert (siehe markierte Fläche in D), bei denen es sich wahrscheinlich um die EP einer motorischen Einheit handelt. Da jedoch nicht endgültig davon ausgegangen werden kann, dass alle EP von demselben Motoneuron innerviert sind, wird hier die Verwendung des Begriffes *Cluster* vorgezogen. Um den Innervationsstatus des jeweiligen Muskels bestmöglich zu erfassen, wurde sowohl die Anzahl der *Cluster* pro mm² als auch die maximale Anzahl EP (α Btx-positiv) pro *Cluster* sowie der Anteil innervierter EP (α Btx-VACHT-Kolo-kalisation) quantifiziert.

Bezüglich des Rückgangs der *Cluster*-Anzahl zeigte sich in beiden untersuchten Muskeln dasselbe Bild (siehe 3.1.6.5. A und B): Bei zweiwöchiger Symptomatik war die Anzahl der *Cluster* sowohl bei RAMP1-defizienten als auch RAMP1-kompetenten Tieren im Vergleich zum Wildtyp in gleichen Maßen reduziert (genaue Werte siehe Tabelle 3.1.6.) und auch nach einer weiteren deutlichen Reduktion der *Cluster*-Zahl bei sechswöchiger Symptomatik zeigten sich keinerlei Unterschiede. Bei einem Vergleich von Tieren desselben Alters ergaben sich aufgrund des frühen Symptomstarts der RAMP1-defizienten Tiere hingegen deutliche Unterschiede zu den RAMP1-kompetenten Tieren, die an P60 noch keinen signifikanten Unterschied zum Wildtyp zeigten (M. quadriceps: TG:WT (0x/P60): $5,7 \pm 0,5$ vs. WT:WT (0x/P60): $6,5 \pm 0,6$; ns; TG:KO (2x/P60): $5,0 \pm 0,4$; $p < 0,05$).

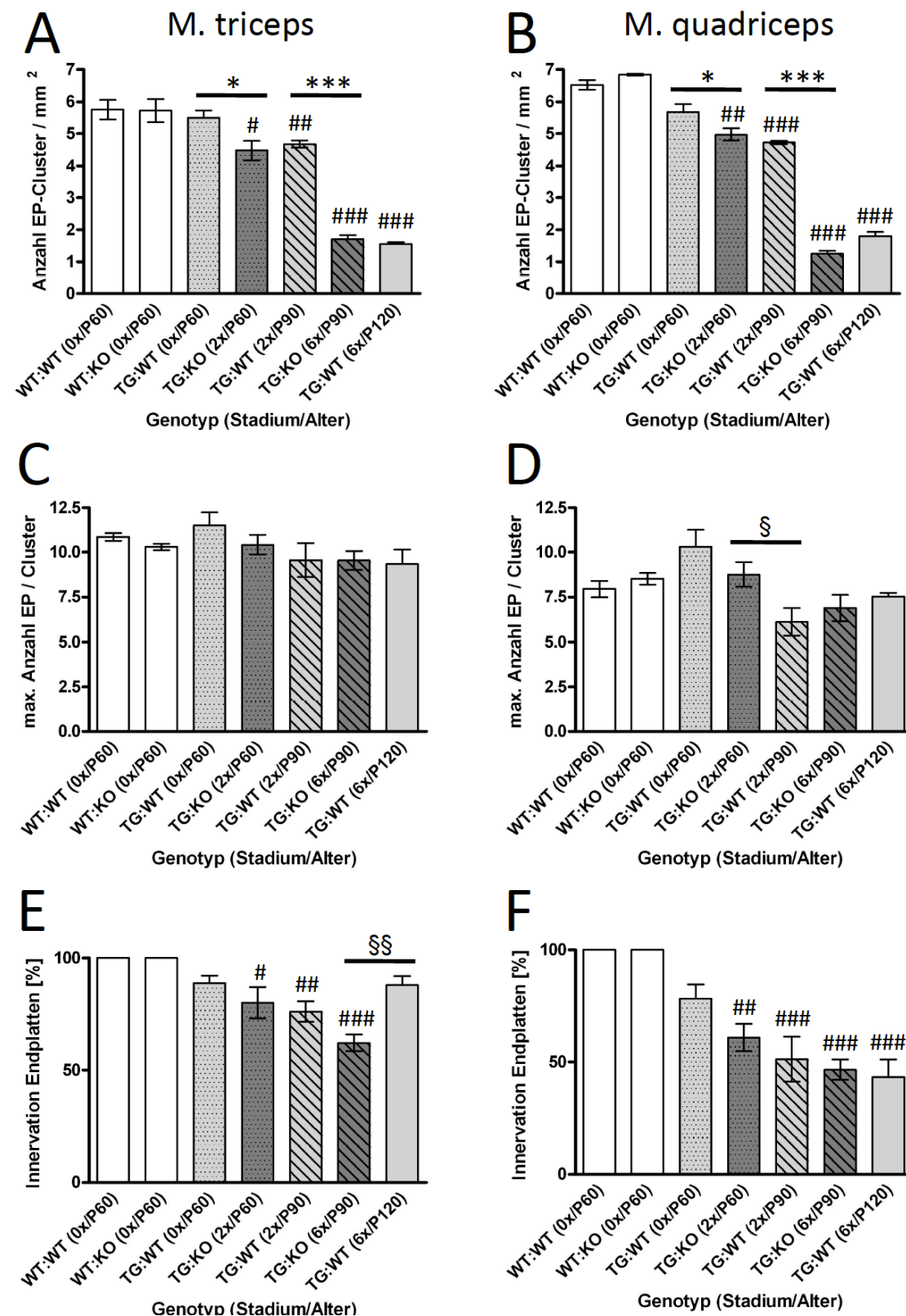


Abb. 3.1.6.5.: Innervationsstatus der Muskulatur in RAMP1-kompetenten und –defizienten Tieren. WT: Wildtyp, TG: SOD1-transgen, KO: RAMP1-Knockout. 0x, 2x, 6x: symptomatische Wochen im PaGE. P: postnataler Tag. EP: Endplatte. #: signifikante Unterschiede transgener Tiere zum jeweiligen Wildtyp, * signifikante Unterschiede altersgleicher Tiere. §: signifikante Unterschiede transgener Tiere gleichen Stadiums. Signifikanzniveaus z.B. #: $p < 0,05$; ##: $p < 0,01$; ###: $p < 0,001$.

Noch ausgeprägter fand sich dieser Effekt an P90 (M. quadriceps: TG:WT (2x/P90): $4,7 \pm 0,1$ vs. TG:KO (6x/P90): $1,3 \pm 0,2$; $p < 0,001$), wo sich RAMP1-kompetente Tiere erst in der frühsymptomatischen Phase befanden, während RAMP1-defiziente Tiere schon weitgehend gelähmt waren. Die Anzahl der EP-Cluster spiegelte also exakt den klinischen Symptomstatus im PaGE wider. Bemerkenswert ist jedoch die Tatsache, dass auch der M.triceps dasselbe histopathologische Muster zeigte, obwohl die Symptomatik im dazugehörigen Griffstärketest keine Unterschiede zwischen RAMP1-kompetenden und –defizienten Tieren zeigte.

Bezüglich der maximalen Anzahl EP innerhalb der (verbleibenden) Cluster, ergaben sich weder in einem der beiden Muskeln noch für einen der RAMP1-Genotypen signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp- und SOD1-transgenen Tieren (siehe Abb. 3.1.6.5. C und D). Lediglich im Vergleich SOD1-transgener Tiere mit zweiwöchiger Symptomatik zeigte sich im M.quadriceps bei RAMP1-kompetenten Tieren eine Reduktion der maximalen EP-Zahl gegenüber RAMP1-defizienten Geschwistertieren (TG:WT (2x/P90): $6,1 \pm 1,7$ vs. TG:KO (2x/P60): $8,8 \pm 1,5$; $p < 0,05$).

Tabelle 3.1.6.: Innervationsstatus der Muskulatur in RAMP1-kompetenten und –defizienten Tieren. WT: Wildtyp, TG: SOD1-transgen, KO: RAMP1-Knockout. 0x, 2x, 6x: symptomatische Wochen im PaGE. P: postnataler Tag. EP: Endplatte. Zur Definition eines Clusters siehe Abb. 3.1.6.4..Angegeben sind Mittelwert \pm Standardabweichung.

Triceps	Cluster/mm ²	EP/Cluster	Innervation [%]
WT:WT (0x/P60)	5,8 +/- 0,6	10,9 +/- 0,4	100,0 +/- 0,0
WT:KO (0x/P60)	5,7 +/- 0,7	10,3 +/- 0,4	100,0 +/- 0,0
TG:WT (0x/P60)	5,5 +/- 0,5	11,5 +/- 1,5	88,8 +/- 6,7
TG:KO (2x/P60)	4,5 +/- 0,6	10,4 +/- 1,2	80,0 +/- 15,7
TG:WT (2x/P90)	4,7 +/- 0,2	9,6 +/- 2,1	76,1 +/- 10,3
TG:KO (6x/P90)	1,7 +/- 0,2	9,5 +/- 1,2	62,2 +/- 8,3
TG:WT (6x/P120)	1,6 +/- 0,1	9,4 +/- 1,6	88,0 +/- 7,9
Quadriceps	Cluster/mm ²	EP/Cluster	Innervation [%]
WT:WT (0x/P60)	6,5 +/- 0,3	8,0 +/- 0,9	100 +/- 0,0
WT:KO (0x/P60)	6,9 +/- 0,1	8,5 +/- 0,6	100 +/- 0,0
TG:WT (0x/P60)	5,7 +/- 0,5	10,3 +/- 1,9	78,3 +/- 12,4
TG:KO (2x/P60)	5,0 +/- 0,4	8,8 +/- 1,5	60,9 +/- 13,7
TG:WT (2x/P90)	4,7 +/- 0,1	6,1 +/- 1,7	51,3 +/- 22,5
TG:KO (6x/P90)	1,3 +/- 0,2	6,9 +/- 1,6	46,6 +/- 10,2
TG:WT (6x/P120)	1,8 +/- 0,3	7,5 +/- 0,4	43,4 +/- 15,8

Bezüglich der Innervation bestätigten sich zunächst in beiden Muskeln die Ergebnisse aus der Literatur (Pun et al. 2006, siehe 1.2.4.), dass auch schon bei präsymptomatischen Tieren vereinzelte EP denerviert sind (Abb. 3.1.6.5. E und F, TG:WT (0x/P60): M.triceps: $88,8 \pm 6,7\%$; M.quadriceps: $78,3 \pm 12,4\%$).

Während im M.quadriceps der Anteil innervierter EP mit fortschreitender Symptomatik ohne Unterschiede zwischen RAMP1-defizienten und –kompetenten Tieren weiter sank und im Endstadium in beiden Fällen unter 50% lag (siehe Tabelle 3.1.6.), zeigte sich im M.triceps ein etwas anderes Bild: zwar nahm der Anteil noch innervierter EP bei zweiwöchiger Symptomatik in RAMP1-kompetenten und –defizienten Tieren gleichmäßig ab (TG:WT (2x/P90): $76,1 \pm 10,3\%$ vs. TG:KO (2x/P60): $80,0 \pm 15,7\%$; ns). Doch während er nach sechswöchiger Symptomatik bei RAMP1-defizienten Tieren weiter sank, nahm er bei RAMP1-kompetenten wieder zu (TG:KO (6x/P90): $62,2 \pm 8,3\%$ vs. TG:WT (6x/P120): $88,0 \pm 7,9\%$; $p < 0,01$), so dass sich der relative Innervationsstatus der Endplatten RAMP1-kompetenter Tiere im Endstadium nicht von dem des präsymptomatischen Stadiums unterschied. Zu bemerken ist allerdings, dass sich dieser relative Wert auf die wenigen, verbleibenden EP bezieht, während die absolute Zahl bei RAMP1-kompetenten Tieren ebenso reduziert war wie bei RAMP1-defizienten Tieren (vergleiche oben und Abb. 3.1.6.5. A)

Es ist also festzustellen, dass die Neuroinflammation in RAMP1-defizienten SOD1-transgenen Tieren zwar insgesamt schwächer ausfiel als in RAMP1-kompetenten Tieren, aber trotzdem zeitgleich ablief, also nicht mit der Symptomatik im PaGE, sondern dem Alter der Tiere korrelierte. Ausschlaggebend für die früher einsetzende PaGE-Symptomatik bei RAMP1-defizienten Tieren war statt dessen ein früheres Einsetzen der Neurodegeneration vor allem im lumbalen Rückenmark sowie die Effekte in der Peripherie, wo RAMP1-defiziente SOD1-transgene Tiere deutlich früher denervierte Endplatten (EP) aufwiesen als ihre RAMP1-kompetenten Geschwister. Vor allem die Anzahl noch vorhandener EP-Cluster, also vermutlich motorischer Einheiten und damit intakter Motoneurone, korrelierte mit dem Symptomstatus im PaGE. Unterschiede zwischen symptomgleichen Tieren traten hier nicht auf, während deutliche Unterschiede in altersgleichen Tieren zu beobachten waren.

3.2 Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide

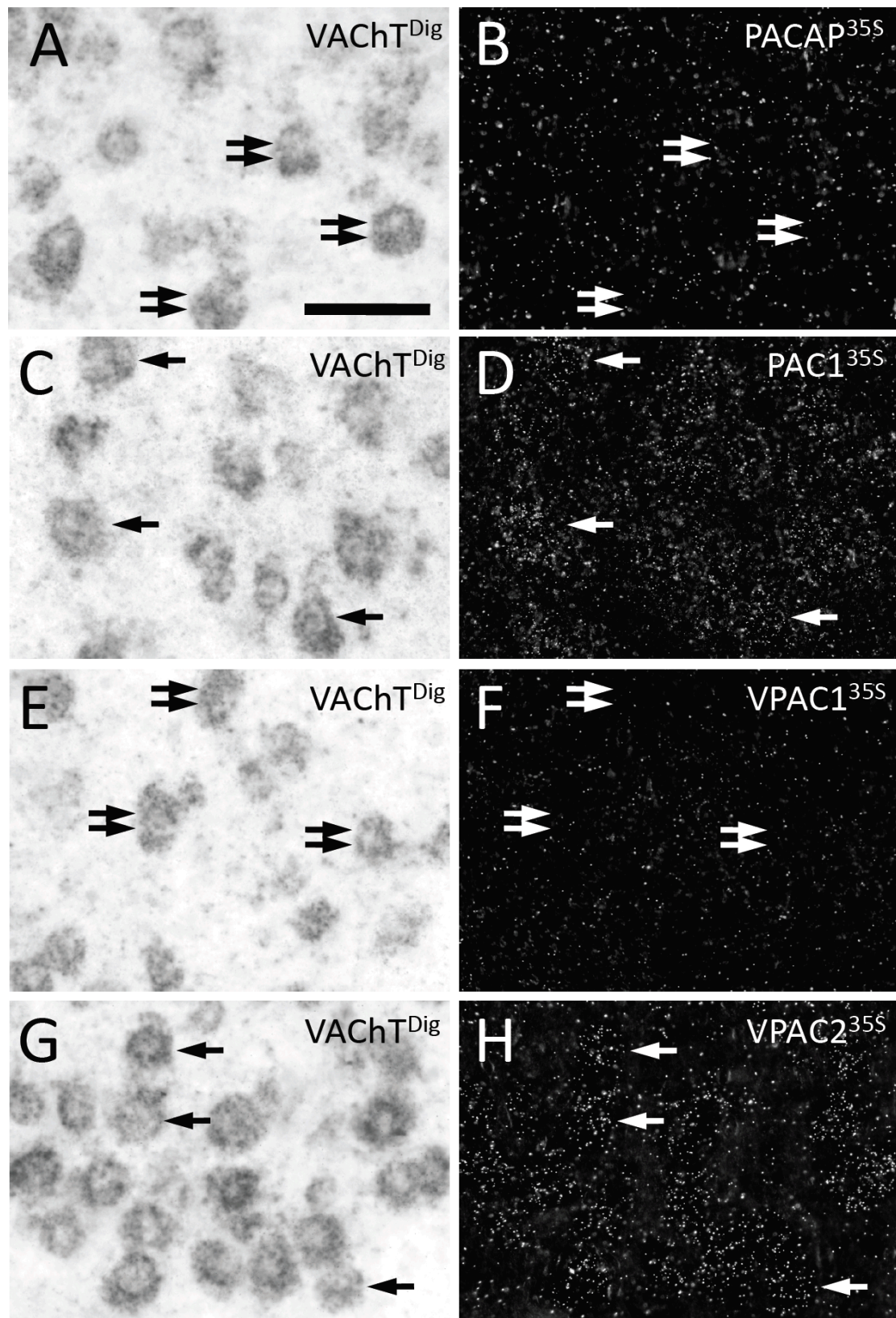
Um zu beurteilen, in wie weit endogenes PACAP eine Rolle im Krankheitsverlauf der ALS spielt, sollten zunächst die Expressionsprofile von PACAP und seinen Rezeptoren PAC1, VPAC1 und VPAC2 in den an der ALS-Pathologie beteiligten Zelltypen, d.h. Motoneuronen, Astrozyten und Mikroglia geklärt werden. Da zwar für PACAP, nicht aber für die Rezeptoren Antikörper zur Verfügung standen, erfolgte diese Analyse v.a. mittels *in situ*-Hybridisierung und PCR im Wildtyp, bevor Veränderungen des Expressionsprofils in SOD1-transgenen Tieren untersucht und letztendlich der Effekt einer PACAP-Deletion auf den Krankheitsverlauf ermittelt werden sollte.

3.2.1 Expressionsprofil von PACAP und seiner Rezeptoren im Wildtyp

Zur Klärung der Expressionsprofile in ALS-relevanten Gehirnbereichen bzw. Zelltypen wurde sich der von Norman Kalmbach etablierten Ribosonden und PCR-Primer für PACAP und die Rezeptoren PAC1, VPAC1 und VPAC2 bedient. Im Fall von PAC1 wurde sich für eine nicht zwischen den Splicevarianten unterscheidende, aber alle Isoformen detektierende Ribosonde bzw. Primerkombination entschieden.

3.2.1.1 *In situ*-Hybridisierung

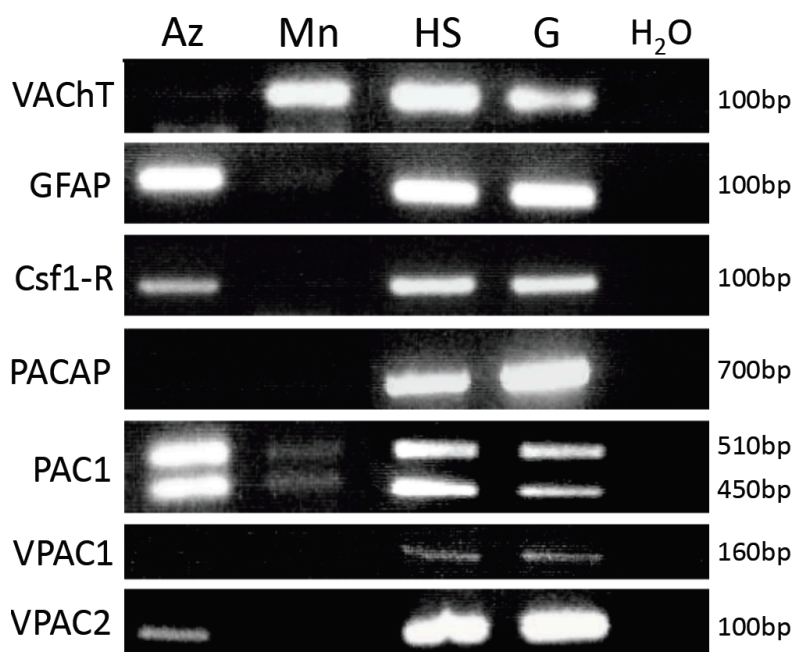
Benachbarte Gehirn-Sagittalschnitte mit ALS-relevanten Arealen, d.h. verschiedenen motorischen Hirnnervenkernen mehrerer Wildtyp-Tiere wurden jeweils mit radioaktiv (^{35}S)-markierten Ribosonden für PACAP, PAC1, VPAC1 oder VPAC2 hybridisiert. Eine Ko-Hybridisierung mit einer Digoxigenin (Dig)-markierten Ribosonde gegen VACHT (vesikulärer Acetylcholintransporter) diente der Lokalisation der Motoneurone und damit der Möglichkeit, im Fall von positiven Signalen der Radioaktivsonden Rückschlüsse auf den exprimierenden Zelltyp ziehen zu können. Obwohl alle Ribosonden in den jeweiligen, als Positivkontrolle dienenden Arealen (z.B. Hypothalamus) starke Signale aufwiesen, war in den motorischen Arealen, wie hier beispielhaft für den Ncl. facialis gezeigt (Abb. 3.2.1.1.), nur für PAC1 (C und D) und VPAC2 (G und H) ein schwaches Signal erkennbar, das in beiden Fällen hauptsächlich über den Motoneuronen lokalisierte (Einfachpfeile). PACAP (A und B) und VPAC1 hingegen zeigten keinerlei Signal über den Motoneuronen (Doppelpfeile); die wenigen, die Neurone umrundenden Signale waren als Hintergrund zu bewerten.



3.2.1.1.: Expression von PACAP und seiner Rezeptoren im Nucleus facialis. Links: Hellfeldaufnahmen der Dig-markierten VACHT-Sonden zur Identifikation der Motoneurone im Nucleus facialis eines Wildtyp-Tiers (P120). Rechts: Ko-hybridisierte ³⁵S-markierte Ribosonden gegen PACAP (A und B), PAC1 (C und D), VPAC1 (E und F) und VPAC2 (G und H). Einfachpfeile: Motoneurone mit Radioaktiv-Signal, Doppelpfeile: Motoneuronen ohne Radioaktiv-Signal. Balken in (A) entspricht 50 µm und gilt auch für (B) bis (H).

3.2.1.2 PCR an isolierten Zelltypen

Um das in der *in situ*-Hybridisierung erhaltene schwache Signal auf seine Richtigkeit und die Zelltypen isoliert auf ihr Expressionsprofil zu untersuchen, wurde die mRNA aus primären Astrozytenkulturen sowie aus über Laser-Dissektions-Mikroskopie gewonnenen Motoneuronen aus dem Nucleus facialis isoliert, in cDNA umgeschoben und mit spezifischen Primern via PCR analysiert. Da Mikroglia schwer in Einzelkultur zu halten sind auch nicht einzeln dissektiert werden können, war eine Analyse dieses Zelltyp nicht möglich. Als Positivkontrollen wurde die mRNA aus einem Sagittalschnitt des Hirnstamms (HS) und des Gesamtgehirns (G) verwendet.



3.2.1.2.: Expression von PACAP und seiner Rezeptoren in ALS-relevanten Zelltypen. Az: kortikale Astrozyten aus Primärkultur, MN: Durch Laser-Mikrodissektion isolierte Motoneuronen des Nucleus facialis. HS: Hirnstamm, G: Gesamtgehirn (beide mediale Sagittalschnitte). VACHT: vesiculärer Acetylcholin-transporter (Motoneuronenmarker), GFAP: *glial fibrillary acidic protein* (Astrozytenmarker), Csf1-R: *Colony-stimulating factor* 1-Rezeptor (Mikroglia marker), bp: Basenpaare. PAC1 Primerkombination umgreift die Insertionsstelle der Splice-kassetten: 450bp ohne Insertion, 510bp mit Insertion der hip- oder hop-Kassette.

Die Motoneurone (Mn) zeigten ein deutliches Signal für den spezifischen Marker und damit als Positivkontrolle dienenden VACHT (siehe Abb. 3.2.1.2.), nicht aber für den Astro- bzw. Mikroglia Marker GFAP bzw. Csf1-R; es wurden also ausschließlich Motoneurone dissektiert. Die Astrozyten (Az) zeigten zwar kein Signal für VACHT, es tauchte jedoch eine Bande

für Csf1-R auf, was darauf hindeutete, dass die Primärkultur eine leichte Verunreinigung mit Mikrogliazellen enthielt, weshalb der Ursprung anderer Banden nicht eindeutig auf einen dieser beiden Zelltypen zurückgeführt werden konnte.

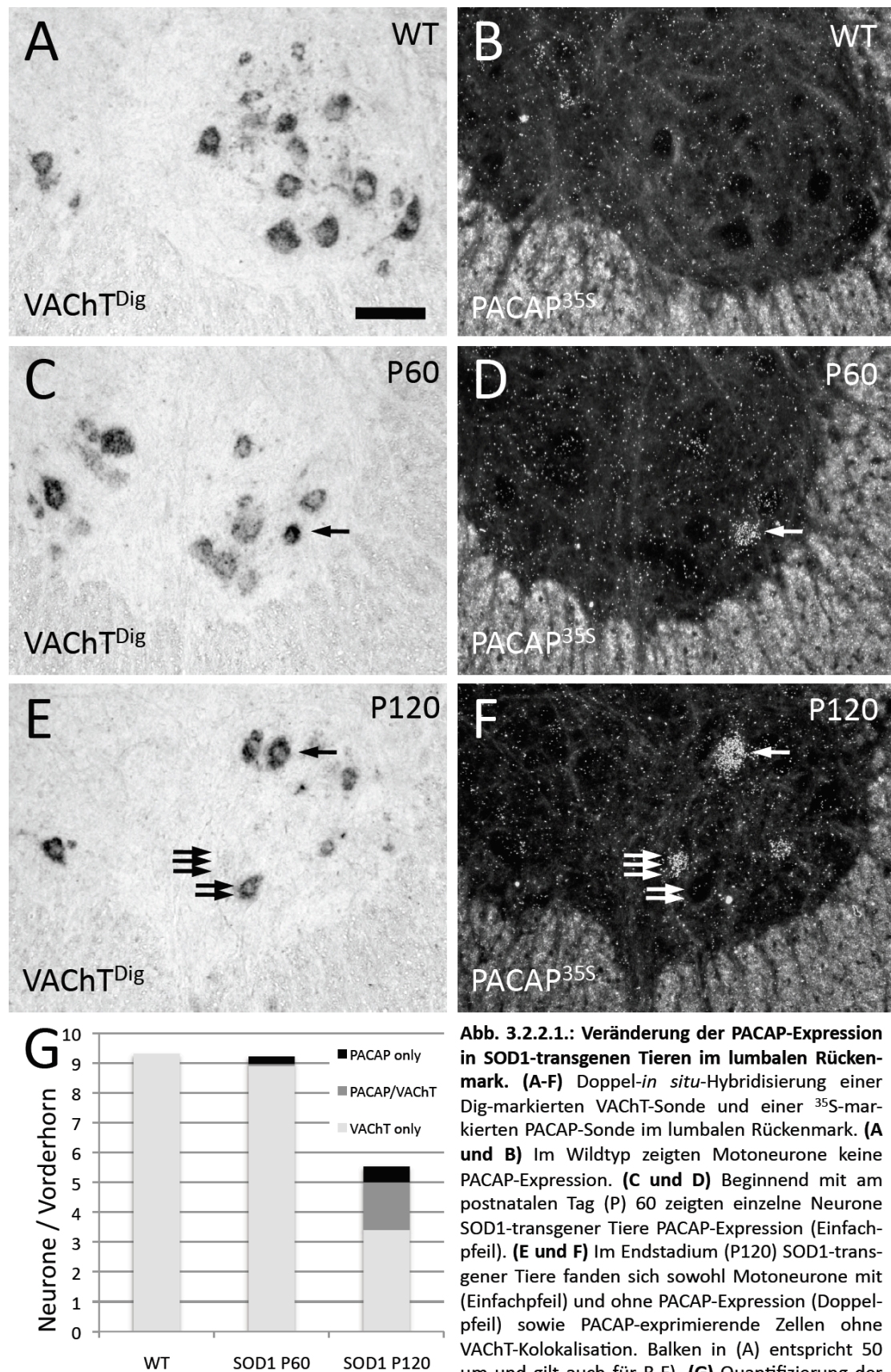
PACAP zeigte ausschließlich in den Positivkontrollen (siehe Abb. 3.2.1.2. HS und G) eine deutliche Bande, wurde also weder von (kultivierten) Gliazellen (Az) noch (dissektierten) Motoneuronen (Mn) exprimiert. PAC1 hingegen wurde sowohl von Gliazellen als auch Motoneuronen exprimiert, wobei der Einsatz der gleichen Menge cDNA mit Einschränkungen das Urteil erlaubte, dass Gliazellen eine sehr starke, Motoneurone nur eine schwache PAC1-Expression aufwiesen. VPAC1 hingegen wurde von keinem der fraglichen Zelltypen exprimiert, VPAC2 nur von Gliazellen, nicht aber Motoneuronen.

Diese Ergebnisse bestätigen die Befunde der *in situ*-Hybridisierung und die auf Basis der Literatur getroffenen Erwartungen. Vor allem die über PAC-1 vermittelten neuroprotektiven Reaktionswege in Astrozyten und Motoneuronen könnten also auch in der ALS-Pathologie eine wichtige Rolle spielen.

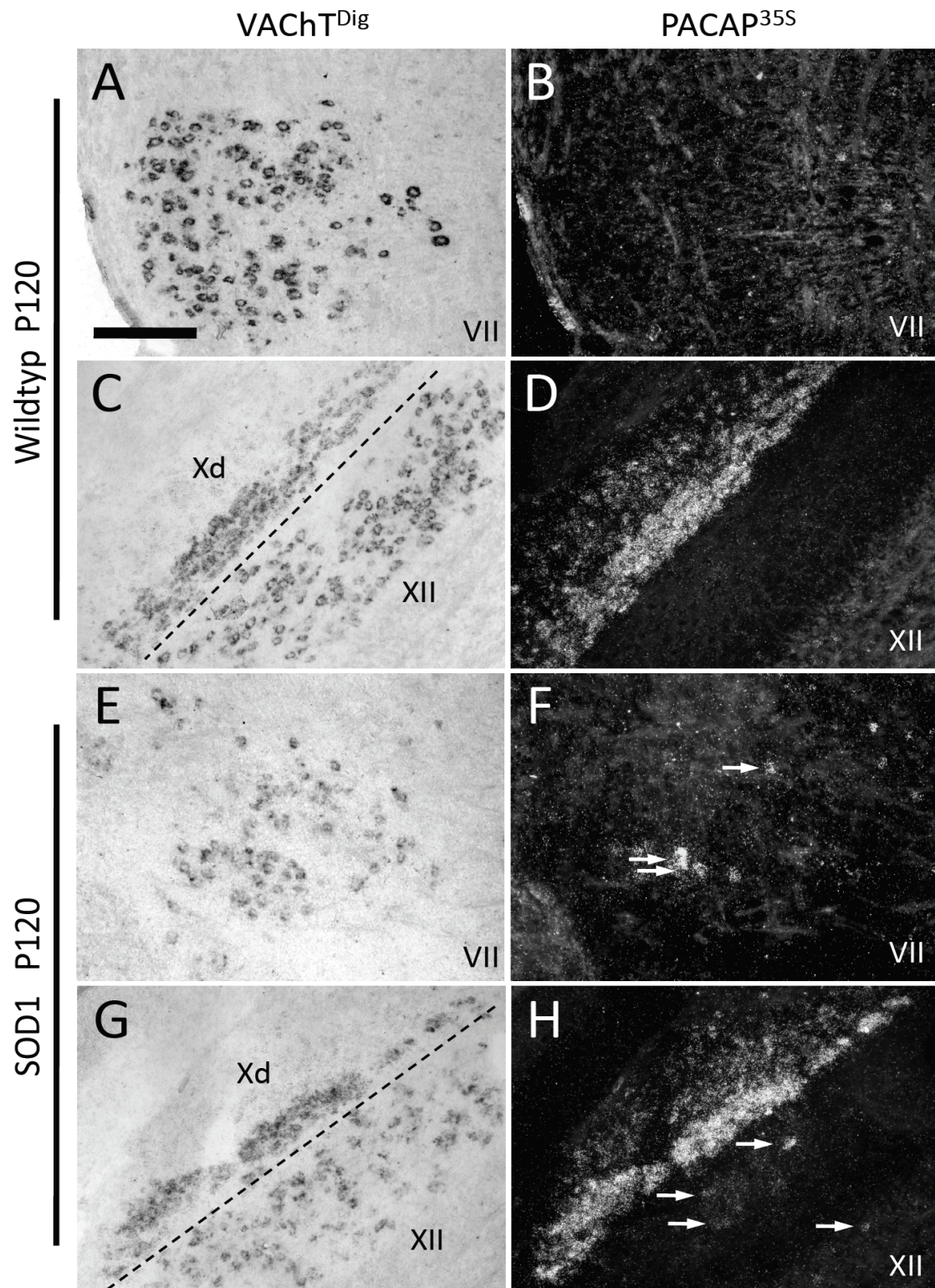
3.2.2 Veränderung der PACAP-Expression im SOD1-Mausmodell

Um festzustellen, ob sich die oben ermittelten Expressionsprofile im Zeitverlauf der ALS-Erkrankung verändern, wurden motorische Areale in Gehirn und lumbalem Rückenmark von je 4 SOD1-transgenen Tieren im präsymptomatischen Stadium (P60) und im Endstadium (P120) untereinander sowie mit Wildtypen gleichen Alters verglichen.

Während in den Expressionsprofilen der Rezeptoren keinerlei Unterschied zwischen SOD1-transgenen Tieren der analysierten Stadien und dem Wildtyp zu beobachten war, traten bei PACAP Veränderungen auf. Im zuvor noch nicht untersuchten lumbalen Rückenmark war im Wildtyp ebenso wie im Gehirn keine PACAP-Expression in den Motoneuronen zu beobachten (siehe Abb. 3.2.2.1. A und B). In SOD1-transgenen Tieren waren jedoch bereits an P60 (C und D) vereinzelt PACAP-positive Neurone zu beobachten (Einfachpfeil), deren Anteil bis zum Endstadium (E und F) deutlich zunahm. Unklar blieb allerdings die Identität einiger Neurone. Zwar gab es eindeutig PACAP-positive Motoneurone (VACHT-komarkiert, Einfachpfeil in E und F), doch fanden sich ebenso unter den wenigen überlebenden Motoneuronen solche ohne PACAP-Expression (Doppelpfeil) als auch PACAP-positive Neurone ohne VACHT-Komarkierung (Dreifachpfeil).



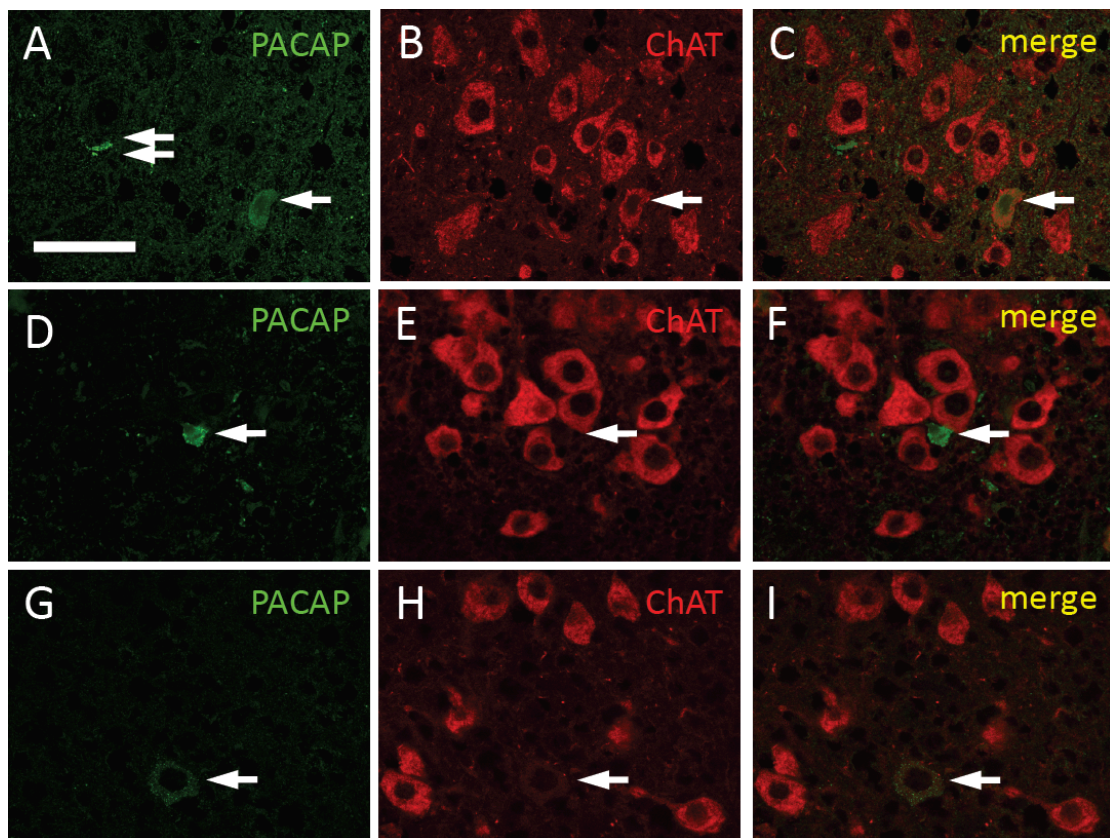
Veränderung der PACAP-Expression. VACHT_{only}: Motoneuronen ohne PACAP-Expression, PACAP/VACHT: Motoneurone mit PACAP-Expression. PACAP_{only}: Neurone mit PACAP-Expression ohne VACHT-Markierung. Auf Einzeichnung von Fehlerbalken wurde der Übersicht halber verzichtet, alle Mittelwerte und Standardabweichungen sind im Text angegeben.



3.2.2.2.: Veränderung der PACAP-Expression in SOD1-transgenen Tieren in somatomotorischen Nuclei im Hirnstamm. Doppel *in situ*-Hybridisierung einer Dig-markierten VACHT-Sonde zur Detektion der Motoneurone im Hellfeld (links) und einer ³⁵S-markierten PACAP-Sonde zur Detektion der PACAP-Expression im Dunkelfeld (rechts). (A-D) Im Wildtyp zeigten somatomotorische Motoneuronen im Ncl. facialis (VII, A und B) und im Ncl. hypoglossus (XII, C und D) keine PACAP-Expression. Deutliche PACAP-Expression im direkt benachbarten Ncl. dorsalis nervus vagii (Xd, C und D) diente als Positivkontrolle. (E-F) Im Endstadium SOD1-transgener Tiere war in einigen wenigen somatomotorischen Neuronen eine deutliche PACAP-Expression zu beobachten (Pfeile). Balken in A entspricht 50 µm und gilt auch für B-H.

Eine Quantifizierung (Abb. 3.2.2.1 G) ergab für den Wildtyp im lateralen Vorderhorn des Lumbalmarks durchschnittlich $9,3 \pm 2,0$ Motoneurone, von denen keines PACAP-Expression zeigte (VACHT*only*). An P60 war in SOD1-transgenen Tieren noch kein Verlust von Motoneuronen zu beobachten ($8,9 \pm 0,4$), doch fanden sich bereits $0,6 \pm 0,4$ Motoneurone mit PACAP-Expression (PACAP/VACHT) sowie $0,25 \pm 0,5$ PACAP-exprimierende Neurone ohne VACHT-Komarkierung (PACAP*only*). Im Endstadium verblieben noch durchschnittlich $5,0 \pm 2,2$ Motoneuronen ohne (VACHT*only*) sowie $1,6 \pm 1,2$ Motoneurone mit PACAP-Expression (VACHT/PACAP). Außerdem fanden sich $0,5 \pm 0,7$ PACAP*only*-Neurone.

In den Hirnnervenkernen, hier beispielhaft gezeigt für den Ncl. facialis (VII) und Ncl. hypoglossus (XII, siehe Abb. 3.2.2.2.) war diese Veränderung ebenfalls zu beobachten, doch zeigten sich dort trotz der wesentlich höheren Anzahl an Motoneuronen im Wildtyp (A-D) und einer höheren Anzahl überlebender Motoneurone im Endstadium (E-H, vergleiche 3.1.3.) auch hier nur äußerst vereinzelt (Moto)Neurone mit PACAP-Expression (Pfeile in F und H).



3.2.3.3.: Veränderung der PACAP-Expression in SOD1-transgenen Tieren auf Proteinebene. Doppelimmunfluoreszenz von PACAP (grün) mit dem Motoneuronenmarker Cholinacetyltransferase (ChAT, rot) im Nucleus facialis eines SOD1-transgenen Tieres im Endstadium. Wie in der *in situ*-Hybridisierung (vergleiche Abb. 3.2.2.1.) traten auf: i) PACAP-positive Motoneurone (Einfachpfeil in A-C), deren Immunoreaktivität jedoch deutlich unter derjenigen von PACAP-positiven Fasern (Doppelpfeil) lag; ii) kleine, stark PACAP-positive Neurone ohne ChAT-Kolokalisation (Einfachpfeil in D-F) und iii) große, PACAP-positive Neurone mit an Motoneurone erinnernder Morphologie, aber nicht eindeutiger ChAT-Kolokalisation (Einfachpfeil in G-I). Balken in A entspricht 50 μ m und gilt auch für B – I).

Die Induktion der PACAP-Expression im SOD1-transgenen Tier war auch auf Proteinebene nachzuweisen. Während im Wildtyp die Motoneurone aller Hirnnervenkerne und im Vorderhorn des lumbalen Rückenmarks keine PACAP-Immunoreaktivität (IR) aufwiesen (nicht gezeigt), fanden sich in SOD1-transgenen Tieren im Endstadium vereinzelt PACAP-positive Neurone (siehe Abb. 3.2.5.). Auch dabei trat in einigen Fällen eine Kolo-kalisation mit dem Motoneuronenmarker ChAT (Cholinacetyltransferase) auf (A-C), wobei die PACAP-IR in den Motoneuronen (Einfachpfeil) wesentlich schwächer ausfiel als die IR z.B. in Nervenfasern (Doppelpfeil). Außerdem fanden sich deutlich kleinere, stark PACAP-positive Neurone ohne ChAT-IR (D-F), aber auch große Neurone mit schwacher PACAP-IR (G-H), deren Morphologie an Motoneurone erinnerte, die aber keine (eindeutige) ChAT-IR aufwiesen.

3.2.3 Effekte einer PACAP-Defizienz auf den Krankheitsverlauf der ALS

Um zu ermitteln, inwieweit endogen exprimiertes PACAP in SOD1-transgenen Mäusen einen Effekt auf den Krankheitsverlauf hat, wurde ein PACAP defizienter Mausstamm in das ALS Mausmodell eingekreuzt. Beginnend am postnatalen Tag 49 (P49) wurden mindestens 10 Tiere der folgenden Test- und Kontrollgruppen wöchentlichen Untersuchungen der Gewichts-entwicklung und der drei etablierten Tests motorischer Funktionen (siehe 2.1.3.) unterzogen: Wildtyp-Kontrolle (WT:WT, n = 18), PACAP-defiziente Kontrollgruppe (WT:KO, n = 12), SOD1-Kontrollgruppe (TG:WT, n = 11) sowie die SOD1-transgene und PACAP-defiziente Testgruppe (TG:KO, n = 16). Im Anschluss wurden Gehirn und lumbales Rückenmark von je 4 Tieren eines Genotyps in einem frühen, präsymptomatischen Stadium (P60/70) und im Endstadium (P130-140) einer histologischen Untersuchung zur Quantifizierung der Neurodegeneration und Neuroinflammation unterzogen.

3.2.3.1 Auswirkungen auf den Verlauf der klinischen Symptomatik

Bezüglich der Überlebensrate nach Kaplan-Meyer (siehe Abb. 3.2.3.1.) zeigten die PACAP-defizienten SOD1-Tiere mit 139,5 Tagen im Vergleich zu PACAP-kompetenten Tieren mit 132,0 Tagen wider Erwarten (siehe 1.4.2.) eine signifikant verlängerte Lebensdauer ($p < 0,01$).

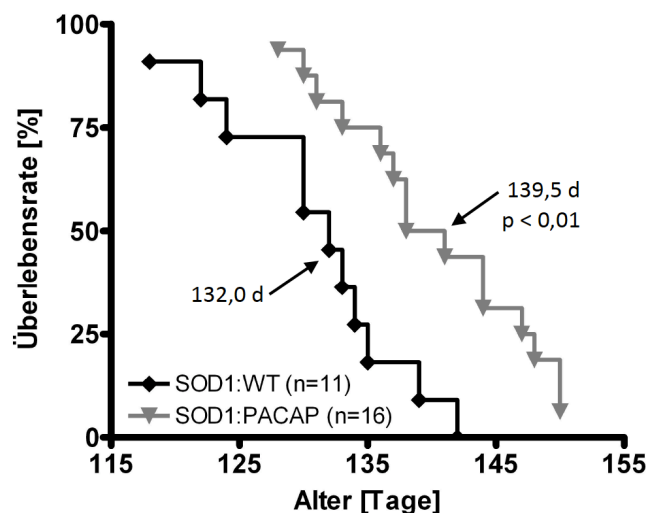


Abb. 3.2.3.1.: Überlebensrate von PACAP-kompetenten und PACAP-defizienten SOD1-transgenen Tieren. Überlebensrate nach Kaplan-Meier. Eingezeichnet ist die mittlere Überlebensrate (50%) in Tagen (d). SOD1: SOD1-transgen, WT: Wildtyp (PACAP-kompetent), PACAP: PACAP-defizient.

Bei der relativen Entwicklung des Körpergewichts (Abb. 3.2.3.2. A und B) traten Unterschiede zwischen Wildtyp- und SOD1-transgenen Tieren bei PACAP-kompetenten Tieren ab P112 auf, bei PACAP-defizienten ab P119 (beide $p < 0,001$). Allerdings war weder im zeitlichen Verlauf der Gesamtgruppe (A) noch nach Angleichung des individuellen Symptomstarts (B) eine Differenz zwischen SOD1-transgenen Tieren mit und ohne PACAP-Deletion zu beobachten. Auch der durchschnittliche Symptomstart bei PACAP-kompetenten Tieren war mit $101,8 \pm 8,5$ Tagen (d) gegenüber den PACAP-defizienten Tieren mit $105,9 \pm 19,8$ d nicht signifikant verändert. Gleiches galt für den PaGE-Test (Abb. 3.2.3.2. C und D), bei dem Unterschiede zwischen Wildtyp- und SOD1-transgenen Tieren bei PACAP-kompetenten und PACAP-defizienten Tieren zeitgleich ab P112 auftraten (beide $p < 0,001$). Der individuelle Symptomstart zeigte mit $113,9 \pm 12,3$ d bei PACAP-kompetenten und $104,1 \pm 16,7$ d bei PACAP-defizienten Tieren ebenfalls keinen signifikanten Unterschied. Differenzen im zeitlichen Verlauf der Symptomentwicklung waren weder bei Tieren gleichen Alters (C) noch nach Angleichung der individuellen Symptomstarts (D) zu beobachten. Auch bezüglich der Griffstärke (Abb. 3.2.3.2. E und F) war bei PACAP-kompetenten und -defizienten Tieren ein ungefähr zeitgleiches Einsetzen der Symptomatik zu beobachten, wobei die Unterschiede zum Wildtyp in beiden Fällen etwas früher auftraten als bei Gewichtsentwicklung und PaGE (TG:WT: P105; $p < 0,001$; TG:KO: P98; $p < 0,01$). Der individuelle Symptomstart zeigte mit durchschnittlich $108,2 \pm 12,7$ d bei PACAP-kompetenten und $99,3 \pm 16,4$ d bei PACAP-defizienten Tieren ebenso wenig statistische Unterschiede wie der Zeitverlauf der Symptoma-

tik bei altersgleichen Tieren (G) oder nach der Angleichung der individuellen Symptomstarts (H).

Ein anderes Bild zeigte sich für die Symptomatik der Zunge (Abb. 3.2.3.2. G und H): Während die PACAP-kompetenten Tiere schon früh Unterschiede zum Wildtyp zeigten (P98, $p < 0,05$, ab P105 $p < 0,001$), traten diese bei PACAP-defizienten Tieren erst wesentlich später auf (ab P126 $p < 0,001$). Außerdem ergab sich in der Endphase der Erkrankung bei altersgleichen Tieren (G) ein signifikanter Unterschied zwischen PACAP-kompetenten und PACAP-defizienten Tieren (ab P119 $p < 0,05$, P133 $p < 0,01$). Zu beachten ist allerdings, dass innerhalb der PACAP-kompetenten Tiere SOD1-transgene Tiere von Beginn an eine durchschnittlich um etwa 1 Hz langsamere Leckfrequenz aufwiesen als nicht-transgene Geschwistertiere (P56-84: WT:WT: $9,8 \pm 0,7$ Hz vs. TG:WT: $8,8 \pm 0,6$ Hz, siehe G und 3.1.5.), während dieser Unterschied innerhalb der PACAP-defizienten Tiere wesentlich geringer war (P56-84: WT:KO: $9,3 \pm 0,8$ Hz vs. TG:KO: $9,0 \pm 0,7$ Hz). Obwohl die Unterschiede in allen Fällen nicht signifikant waren, könnte dieser Umstand der Grund sein, warum die signifikanten Unterschiede im Vergleich zwischen Wildtyp und transgenen Tieren bei PACAP-kompetenten Tieren wesentlich früher auftraten als bei PACAP-defizienten Tieren.

Entsprechend wichtig ist in diesem Fall der Blick auf die Angleichung der Symptomstarts. Dort zeigte sich bei PACAP-kompetenten zwar ebenfalls ein durchschnittlich deutlich früherer Symptomstart als bei PACAP-defizienten Tieren, dieser war aufgrund der hohen Standardabweichung jedoch nicht signifikant (TG:WT: $91,8 \pm 26,8$ d; TG:KO: $107,3 \pm 29,7$ d; ns). Auch im weiteren Verlauf waren bei Angleichung der Symptomstarts keine signifikanten Unterschiede zwischen PACAP-kompetenten und -defizienten Tieren festzustellen (Abb. 3.2.3.2. H). Zu bemerken ist jedoch, dass die PACAP-defizienten Tiere meist nur marginal unter den Schwellenwert von $< 8,5$ Hz fielen. 4 Tiere (25%) zeigten sogar bis zum Tod keine Symptomatik der Zungenmotorik und nur ein einziges PACAP-defizientes Tier (6,25%) fiel unter 6,5 Hz. Bei PACAP-kompetenten Tieren hingegen waren dies 4 (33,3%) und alle Tiere zeigten spätestens bei der letzten Messung einen symptomatischen Wert (deutlich) unter 8,5 Hz.

Es ist also festzuhalten, dass PACAP-defiziente Tiere eine um durchschnittlich 7 Tage verlängerte Überlebensdauer zeigten und im Endstadium eine bessere Funktion der Zunge aufwiesen. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass endogenes PACAP eine negative, d.h. eine den Krankheitsverlauf beschleunigende Rolle innerhalb der ALS-Pathologie auszuüben scheint.

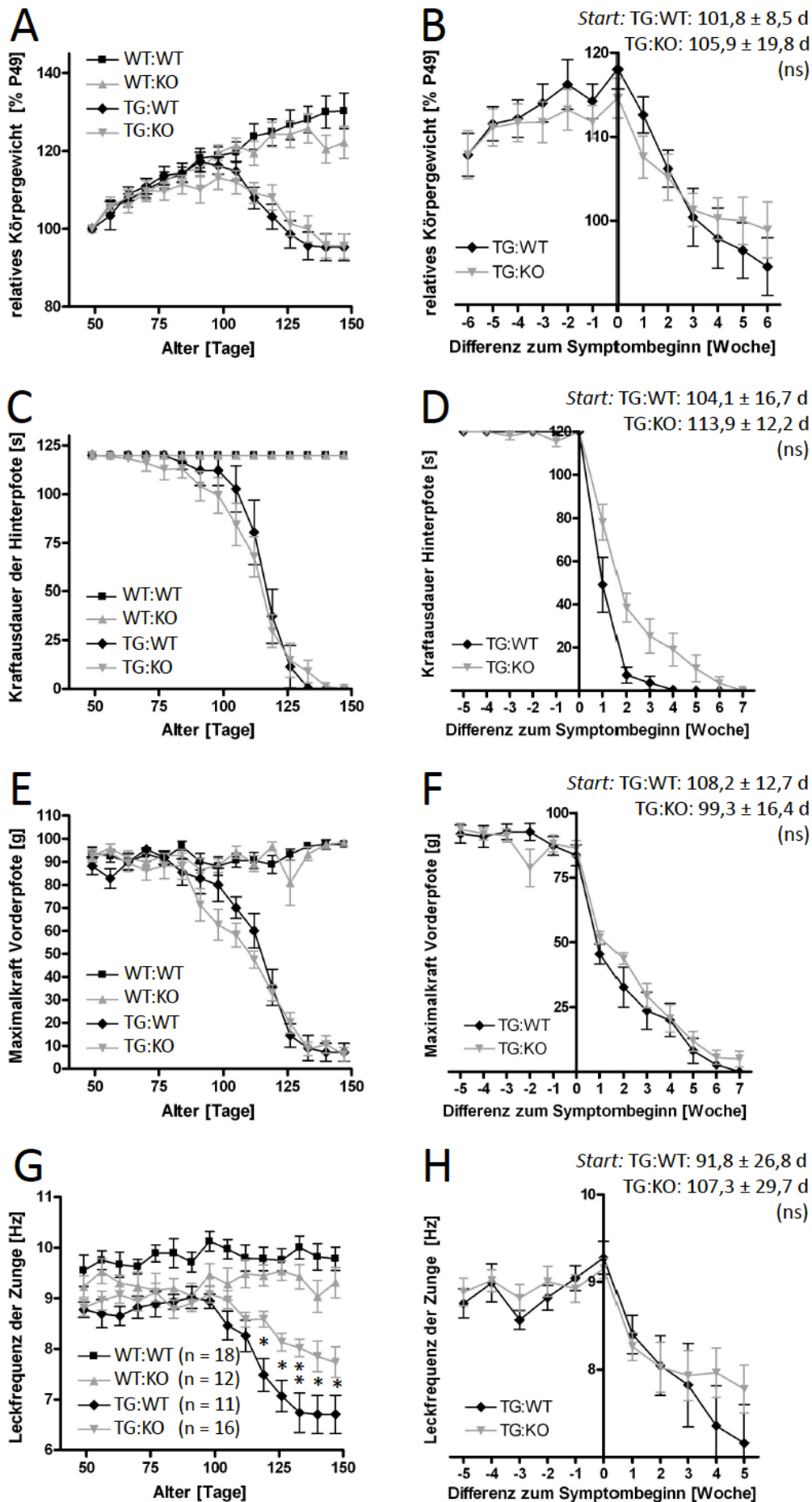


Abb. 3.2.3.2.: (umseitig): Zeitverlauf der Symptomentwicklung von PACAP-kompetenten und PACAP-defizienten SOD1-transgenen Tieren. WT: Wildtyp, TG: SOD1-transgen, KO: PACAP-defizient. Links: alle gemessenen Gruppen im Zeitverlauf. Rechts: Vergleich der SOD1-transgenen Tiere mit und ohne PACAP-Deletion im Zeitverlauf nach Angleichung der individuellen Symptomstarts. Angaben unter „Start“ bezeichnen den durchschnittlichen Symptomstart (Nullpunkt) des jeweiligen Genotyps und eventuell bestehende signifikante Unterschiede, ns: nicht signifikant, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3.2.3.2 Auswirkungen auf Neurodegeneration und Neuroinflammation

Zur Quantifizierung der histopathologischen Veränderungen wurden Gehirn und Rückenmark von zwei Stadien bzw. Altersstufen (frühsymptomatisch P60-70 vs. spätsymptomatisch P120-130) je 4 Tiere einer Gruppe mittels Immunhistochemie untersucht. Pro Tier und Areal wurden je 5 Werte für die Anzahl überlebender Motoneurone, die Aktivierung von Astroglia und Mikroglia sowie die Lymphozyteninfiltration erhoben (siehe Abb. 3.2.3.3.). Während Mikroglia und Lymphozyten ebenso wie die Motoneurone als Einzelzellen gezählt wurden, gestaltete sich eine manuelle oder algorithmenbasierte Auszählung bei Astrozyten aufgrund der vielen verbindenden Fortsätze schwierig, sodass statt Einzelzellen der Anteil GFAP-positiver Fläche an der gemessenen Gesamtfläche (exakte Definitionen von Schnittebene und gemessener Region siehe 2.6.6.) als Maß für die Astrozytenaktivierung verwendet wurde.

Neurodegeneration

Zur Quantifizierung der Neurodegeneration und deren Vergleich zur klinischen Symptomatik wurden die Motoneurone des Ncl. hypoglossus (XII, steuert Zungenmotorik) und des lateralen Vorderhorns im lumbalen Rückenmark (innerviert u.a. Muskulatur der Hinterpfote) ausgezählt. Im Ncl. XII (siehe Abb. 3.2.3.3. B) zeigte sich bei frühsymptomatischen SOD1-transgenen Tieren unabhängig des PACAP-Genotyps noch kein Verlust der Motoneurone im Vergleich zum Wildtyp: (WT:WT (früh): $44,2 \pm 6,3$ vs. TG:WT (früh): $40,7 \pm 8,2$; ns; WT:KO (früh): $48,3 \pm 6,1$ vs. TG:KO (früh): $41,1 \pm 5,4$; ns). Bis zum Endstadium verloren SOD1-transgene Tiere ca. die Hälfte aller Motoneuronen des Ncl. XII, der geringe Unterschied zwischen PACAP-kompetenten und -defizienten Tieren war jedoch nicht signifikant (TG:WT (spät): $27,9 \pm 5,2$ vs. TG:KO (spät): $20,0 \pm 7,7$; ns). Die besseren motorischen Funktionen der Zunge bei PACAP-defizienten Tieren im Endstadium können demnach nicht durch einen geringeren Verlust der Motoneuronen im Ncl. XII erklärt werden.

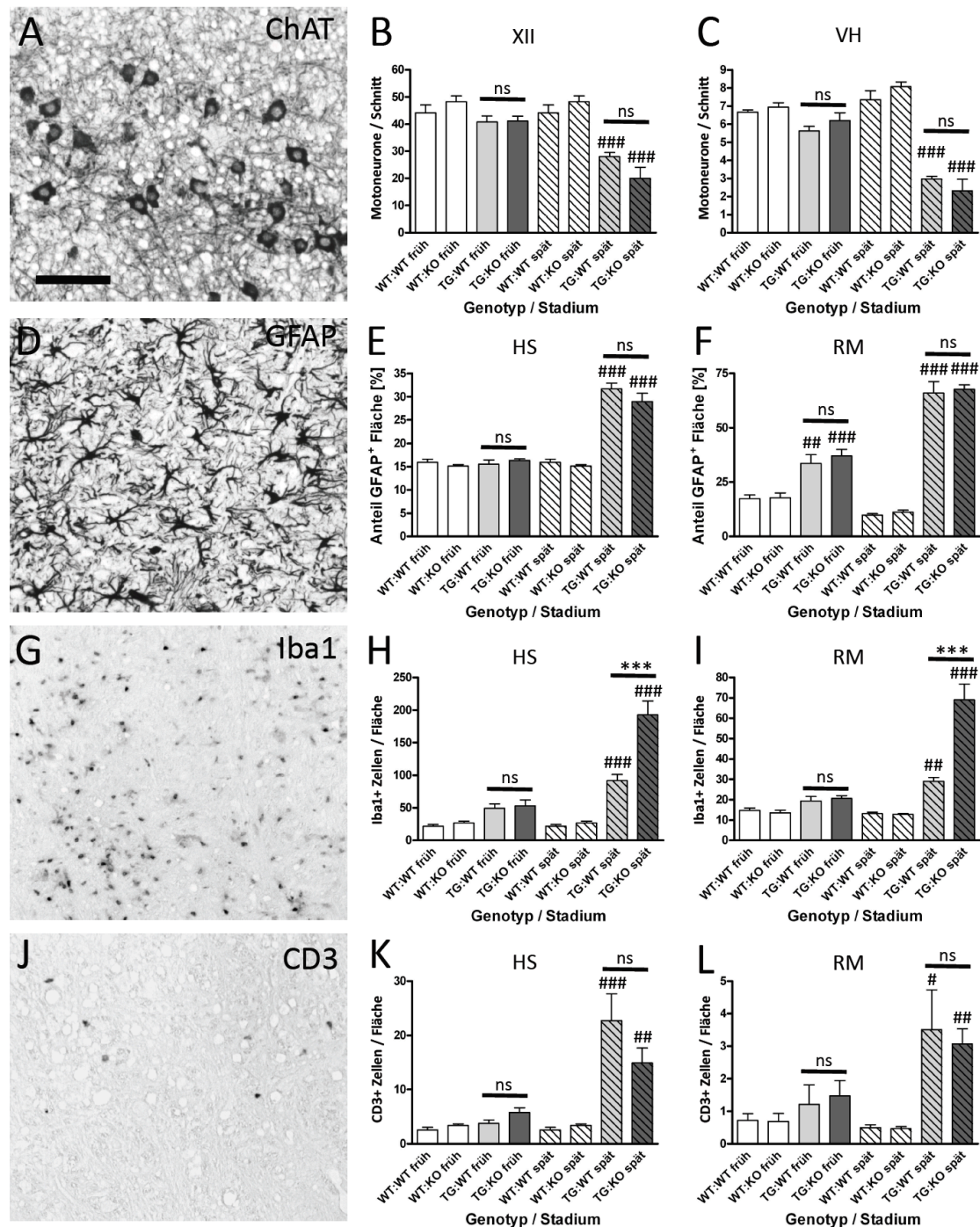


Abb. 3.2.3.3.: Neurodegeneration und Neuroinflammation in PACAP-kompetenten und -defizienten SOD1-transgenen Tieren. Quantifizierung der (A-C) Neurodegeneration mittels Immunfärbung gegen ChAT (A) im Nucleus hypoglossus (B) und dem lateralen Vorderhorn des lumbalen Rückenmarks (C), (D-F) Astrozytenaktivierung mittels Immunfärbung gegen GFAP (D) im medialen Hirnstamm (HS, E) und dem lateralen Vorderhorn des lumbalen Rückenmarks (RM, F), (G-I) Mikrogliaaktivierung mittels Immunfärbung gegen Iba1 (G) im HS (H) und RM (I), (J-L) Lymphozyteninfiltration mittels Immunfärbung gegen CD3 (J) im HS (B) und RM (C). WT: Wildtyp, TG: SOD1-transgen, KO: PACAP-defizient. früh: frühsymptomatisch (P60-70), spät: spätsymptomatisch (Endstadium). #: signifikante Unterschiede transgener Tiere zum jeweiligen Wildtyp, *: signifikante Unterschiede transgener Tiere gleichen Stadiums. Signifikanzniveaus z.B. #: $p < 0,05$; ##: $p < 0,01$; ###: $p < 0,001$; ns: nicht signifikant. Balken in A entspricht 50 μm und gilt auch für D, G und J.

Im lumbalen Rückenmark war bei PACAP-kompetenten SOD1-transgenen Tieren im Frühstadium bereits ein leichter, allerdings nicht signifikanter Verlust an Motoneuronen zu beobachten (WT:WT (früh): $7,0 \pm 1,4$ vs. TG:KO (früh): $5,4 \pm 1,0$; ns), der bei PACAP-defizienten Tieren nicht auftrat (WT:KO (früh): $6,8 \pm 1,3$ vs. TG:KO (früh): $6,7 \pm 1,7$; ns).

Innerhalb der SOD1-transgenen Tiere war der Unterschied zwischen PACAP-kompetenten und PACAP-defizienten Tieren nicht signifikant, ebenso wenig wie im späten Stadium, wo beide Genotypen einen Großteil der Motoneurone verloren hatten (TG:WT (spät): $2,7 \pm 1,3$ vs. TG:KO (spät): $2,6 \pm 1,5$; ns).

Neuroinflammation

Im medialen Hirnstamm war im Frühstadium mit ca. 15% GFAP-positiver Fläche bei allen Genotypen kein Anzeichen der Astrozytenaktivierung bei den SOD1-transgenen Tieren zu beobachten (Abb. 3.2.3.3. E). Bei SOD1-transgenen Tieren im Endstadium hatte sich dieser Anteil verdoppelt und unterschied sich bei beiden PACAP-Genotypen deutlich vom Wildtyp ($p < 0,001$), jedoch fand sich kein Unterschied zwischen PACAP-kompetenten und PACAP-defizienten Tieren (TG:WT (spät): $31,7 \pm 1,7\%$ vs. TG:KO (spät): $29,0 \pm 5,2\%$; ns). Im lumbalen Rückenmark (Abb. 3.2.3.3. F) hingegen war bereits im Frühstadium bei SOD1-transgenen Tieren eine Astrozytenaktivierung zu beobachten (WT:WT (früh): $19,1 \pm 3,0\%$ vs. TG:WT (früh) $38,0 \pm 8,8\%$; $p < 0,01$; WT:KO (früh): $19,3 \pm 3,3\%$ vs. TG:KO (früh) $37,6 \pm 13,7\%$; $p < 0,001$). Zwischen PACAP-kompetenten und PACAP-defizienten Tieren bestand in diesem Stadium kein Unterschied, ebenso wenig wie nach einer weiteren starken Zunahme der Astrozytenaktivierung im Endstadium (TG:WT (spät): $64,2 \pm 11,6\%$ vs. TG:KO (spät): $66,5 \pm 7,8\%$; ns).

Im Gehirn fand sich bei den Mikroglia (siehe 3.2.3.3. H) bei SOD-transgenen Tieren bereits im Frühstadium im Durchschnitt eine deutliche, aufgrund der hohen Varianz jedoch nicht signifikante Erhöhung der Zellzahl (WT:WT (früh): $22,0 \pm 9,1$ vs. TG:WT (früh) $49,4 \pm 22,2$; ns; WT:KO (früh): $26,8 \pm 10,0$ vs. TG:KO (früh) $53,0 \pm 23,0$; ns). Die weitere Zunahme bis zum Endstadium hingegen fiel bei PACAP-kompetenten Tieren wesentlich schwächer aus als bei PACAP-defizienten Tieren (TG:WT (spät): $91,8 \pm 27,3$ vs. TG:KO (spät): $192,8 \pm 53,3$; $p < 0,001$). Im Rückenmark (Abb. 3.2.x. I) fand sich ebenfalls kein Unterschied im Frühstadium (TG:WT (früh): $18,7 \pm 7,1$ vs. TG:KO (früh): $21,5 \pm 5,9$; ns; mit leichter, nicht signifikanter Differenz zu WT:WT (früh): $14,1 \pm 3,7$ bzw. WT:KO (früh) $13,7 \pm 5,6$), gefolgt von einem nur schwachen Zuwachs der Zellzahl bei PACAP-kompetenten gegenüber einem sehr starken bei PACAP-defizienten Tieren (TG:WT (spät): $23,4 \pm 5,1$ vs. TG:KO (spät): $68,1 \pm$

16,2; $p < 0,001$). Zu bemerken ist dabei allerdings, dass sich die Morphologie der Mikroglia zwischen PACAP-kompetenten und –defizienten Tieren ebenfalls stark unterschied (siehe unten), wobei die Immunoreaktivität in den vermutlich bereits degenerierten Glia in PACAP-kompetenten Tieren stark abnahm. In der Folge wurde die Zellen von dem auswertenden Algorithmus nicht mehr erfasst und unterschieden sich nur marginal vom Hintergrund, was eine Anpassung des Schwellenwertes der optischen Dichte ausschloss. Qualitativ betrachtet handelte es sich in beiden Genotypen um eine etwa gleiche Anzahl aktivierter Mikroglia.

Im Fall der Lymphozyten waren weder im medialen Hirnstamm (Abb. 3.2.x K) noch im lumbalen Rückenmark (Abb. 3.2.3.3. L) signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen zu beobachten (medialer Hirnstamm: WT:WT (früh): $2,5 \pm 1,8$ vs. TG:WT (früh) $3,8 \pm 1,4$; WT:KO (früh): $3,4 \pm 1,1$; TG:KO (früh) $5,8 \pm 2,7$; lumbales Rückenmark: WT:WT (früh): $0,6 \pm 0,6$ vs. TG:WT (früh) $1,3 \pm 1,5$; WT:KO (früh): $0,6 \pm 0,6$; TG:KO (früh) $1,6 \pm 1,5$). Im Endstadium fanden sich zwar deutliche Unterschiede zu nicht-transgenen Tieren, doch unterschieden sich PACAP-kompetente und PACAP-defiziente Tiere nicht voneinander (medialer Hirnstamm: TG:WT (spät) $22,7 \pm 9,9$ vs. TG:KO (spät) $14,9 \pm 5,4$; lumbales Rückenmark: TG:WT (spät) $4,0 \pm 3,3$ vs. TG:KO (spät) $3,4 \pm 1,8$).

Es ist also festzustellen, dass sich PACAP-kompetente und PACAP-defiziente SOD1-transgene Tiere bezüglich des Aktivierungsstatus der Mikroglia im Endstadium unterscheiden, wobei die angesprochenen morphologischen Unterschiede im folgenden genauer dargestellt werden.

3.2.3.3 Unterschiede in der Mikroglia-Morphologie

Bei der Quantifizierung der Mikroglia-Aktivierung fiel im Vergleich zwischen PACAP-kompetenten und –defizienten SOD1-transgenen Tieren auf, dass sie sich in der Morphologie der Mikroglia deutlich voneinander unterscheiden.

Während sich die Morphologie zwischen nicht-transgenen Tieren mit und ohne PACAP-Deletion nicht unterschied (Abb. 3.2.3.4.) und beide im Hirnstamm eine moderate Anzahl Zellen mit eher an eine amöboide Mikroglia erinnernde Morphologie (A+B und D+E) und im Kortex die für nicht-aktivierte Mikroglia typische ramifizierte Morphologie aufwiesen (C und F, vergleiche jeweils mit Schemazeichnungen in M), unterschieden sich SOD1-transgene Tiere im Endstadium deutlich. Bei PACAP-kompetenten Tieren waren im Hirnstamm ausschließlich hypertrophe oder bereits degenerierte Mikroglia zu finden (G und H), während die fehlenden Fortsätze der Mikroglia im Kortex (I) auch hier auf eine amöboide Morphologie, d.h. aktivierte Mikroglia hindeuteten. Im Gegensatz dazu waren in PACAP-defizienten Tieren die Mikroglia im Hirnstamm eher dem amöboiden Typ zuzuordnen (J und K), wobei verein-

zelt auch hypertrophe Zellen zu beobachten waren. Im Kortex hingegen zeigten PACAP-defiziente SOD1-transgene Tiere ebenso wie nicht-transgene Tiere überwiegend ramifizierte Mikroglia (L). Die Beobachtung deutete darauf hin, dass in PACAP-defizienten Tieren eine geringere oder verzögerte Aktivierung der Mikroglia auftrat.

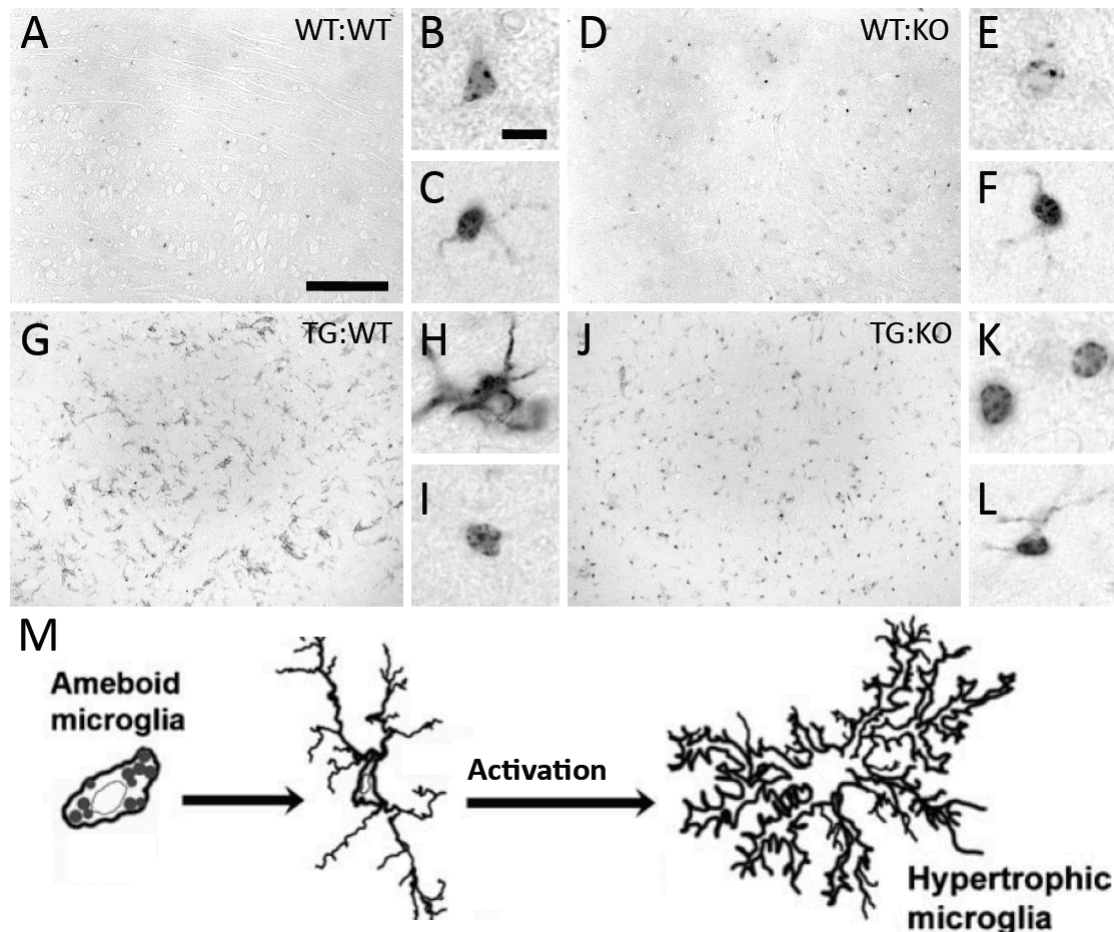


Abb. 3.2.3.4.: Morphologieunterschiede der Mikroglia bei PACAP-kompetenten und -defizienten SOD1-transgenen Tieren im Endstadium. Immunhistochemie mit dem Mikroglia marker Iba1. WT: Wildtyp, KO: PACAP-defizient, TG: SOD1-transgen. A,D,G,J: Übersichtsvergrößerung im Hirnstamm. B,E,H,K: Hochvergrößerung von Mikrogliazellen mit repräsentativer Morphologie im Hirnstamm. C,F,I,L: Hochvergrößerung von Mikrogliazellen mit repräsentativer Morphologie im Kortex. Balken in A entspricht 50 µm und gilt auch für Übersichtsvergrößerungen D,G und J; Balken in B entspricht 5 µm und gilt für alle Hochvergrößerungen. M: Schemazeichnung der Mikroglia-Morphologie, links: amöboid, mitte: ramifiziert, rechts: hypertroph; verändert aus Streit und Xue, 2009.

4 Diskussion

Bei der amyotrophen Lateralsklerose (ALS) handelt es sich um eine tödlich verlaufende, neurodegenerative Erkrankung, für die bisher keine effektiven Therapiemöglichkeiten zur Verfügung stehen. Gekennzeichnet ist die ALS durch den Verlust der Motoneurone, der zur Denervierung der Muskulatur und letztendlich dem Tod durch Atemlähmung führt. Die molekularen Ursachen der ALS sind vielfältig und bis heute nur unzureichend aufgeklärt, viele im Mausmodell wirksamen Substanzen sind in klinischen Studien am Menschen gescheitert. Neben der Ursachenforschung bezüglich genetischer Dispositionen und Auslösern des oxidativen Stresses sind vor allem die Rolle der mit der Motoneuronendegeneration einhergehenden Neuroinflammation und die molekularen Unterschiede zwischen ALS-vulnerablen und ALS-resistenten Motoneuronen ein zentraler Punkt der aktuellen Forschung.

Obwohl der neuroprotektive Einfluss verschiedener Neuropeptide in vielen anderen neurodegenerativen Erkrankungen oder Fällen neuronaler Schädigung wie Ischämie oder Axotomie lange bekannt ist, wurde deren Rolle im Krankheitsverlauf der ALS und damit das eventuelle therapeutische Potenzial entsprechender Agonisten und Antagonisten bisher kaum untersucht. In der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle der aussichtsreichsten Kandidaten *Calcitonin gene-related Peptide* (CGRP) und *Pituitary adenylate cyclase-activating Polypeptide* (PACAP) im Krankheitsverlauf der ALS aufgeklärt werden.

4.1 Calcitonin gene-related Peptide

Calcitonin gene-related Peptide (CGRP) ist ein im ZNS weit verbreitetes Neuropeptid mit vielfältigen Funktionen als starker Vasodilator, in der Schmerzregulation, bei der peripheren und zentralen Inflammation sowie der Regulation autonomer Funktionen. Es sind zwei Isoformen (α CGRP und β CGRP) bekannt, die meist ko-exprimiert werden und mit gleicher Affinität an den CGRP-spezifischen Rezeptorkomplex, einem Heterotrimer aus dem *Calcitonin receptor like receptor* (CRLR), *Receptor affinity modifying protein 1* (RAMP1) und dem *Receptor component protein* (RCP), binden. In einer vorangegangenen Studie (Ringer et al. 2009) konnten bereits Veränderungen der CGRP-Immunoreaktivität im Rückenmark SOD1-transgener Mäuse als ein frühes, histopathologisches Phänomen mit zeitlicher und örtlicher Assoziation zur Astrozytenaktivierung beschrieben werden; analoge und weiterführende Untersuchungen im Gehirn erfolgten mit der vorliegenden Arbeit.

4.1.1 Veränderungen der CGRP-Immunoreaktivität im Gehirn

Der Übersichtlichkeit halber werden hier die Charakteristik der Vakuolisierung und deren Assoziation mit der Astrozytenaktivierung mit der jeweiligen Relevanz in der ALS-Pathogenese und damit für die aktuelle Forschung getrennt besprochen.

4.1.1.1 Charakteristik der Vakuolisierung und ihre Relevanz in der ALS-Pathogenese

Es konnte gezeigt werden, dass auch im Gehirn die Veränderung der CGRP-Immunoreaktivität schon mit dem postnatalen Tag (P) 40 und damit deutlich vor Beginn der klinischen Symptomatik der SOD1-transgenen Tiere auftritt. Betroffen waren dabei allerdings nicht nur die somatomotorischen Hirnnervenkerne, sondern auch nicht-motorische Areale im gesamten Gehirn. Während die somatomotorischen Kerne CGRP-positive Vakuolen sowohl in den Neuriten als auch den Somata aufwiesen, die in großer Anzahl vorlagen und im Endstadium der Erkrankung Durchmesser von bis zu 20 μm erreichten, beschränkte sich die Vakuolisierung in nicht-motorischen Arealen auf die Neuriten. Außerdem variierten Anzahl und Größe der Vakuolen deutlich. Neben den somatomotorischen Arealen fanden sich im Endstadium große Vakuolen in hoher Anzahl in der Substantia nigra, dem Locus coeruleus, dem Nucleus ruber und dem Nucleus anterodorsalis des Thalamus, während sich große Vakuolen in geringerer Dichte im Nucleus accumbens, dem Periaquäduktalen Grau sowie dem Nucleus interpeduncularis des Kleinhirns ausmachen ließen. Viele Vakuolen geringen Durchmessers fanden sich im Bulbus olfactorius und der inferioren Olive. Dieses Muster entspricht im Wesentlichen den Beobachtungen anderer Studien, die jedoch auf der SOD1-Immunoreaktivität der Vakuolen basierten und sich entweder mit mitochondrialen und apoptotischen Markern (Jaarsma et al., 2000) oder der zeitlichen Korrelation mit der Aktivierung von Astrozyten und Mikroglia sowie der Infiltration von Lymphozyten befassen (Leichsenring et al., 2006). Die letztgenannte Studie beschreibt eine caudorostrale Progression der Vakuolisierung mit einem Beginn in den somatomotorischen Hirnnervenkernen an P30-60 und ein Erreichen anteriorer Strukturen wie Hypothalamus oder Kortex erst im Endstadium. Im Gegensatz dazu wurde in der vorliegenden Arbeit trotz Verwendung desselben Mausmodells eine Vakuolisierung z.B. des Bulbus olfactorius oder des Ncl. anterodorsalis im Thalamus ebenfalls an P40, und damit zeitgleich mit den somatomotorischen Nuclei, beobachtet. Während eine caudocranielle Progression (Leichsenring et al.) eher für eine sekundäre Schädigung höherer funktioneller Zentren als Folge der initialen Motoneurondegeneration sprechen würde (sogenannter „*dying forward*“-Mechanismus, (siehe van der Graaff et al., 2009), ist ein zeitgleicher Beginn der Vakuolisierung (vorliegende Arbeit) eher ein Hinweis darauf, dass nicht nur Motoneurone, son-

dern auch Neurone anderer Funktion und/oder Identität eine Vulnerabilität gegenüber den ALS-auslösenden Mechanismen zeigen.

Die nachgewiesene Ko-Immunoreaktivität von SOD1 und dem Marker für cholinerge Neurone Cholinacetyltransferase (ChAT) bzw. CGRP am Rand der Vakuolen in somatomotorischen als auch den meisten extramotorischen Arealen wurde hier zum ersten Mal gezeigt. Eine Co-Immunoreaktivität von SOD1 mit dem Marker dopaminerger und noradrenerger Neurone Tyrosinhydroxylase (TH) in der Substantia nigra und dem Locus coeruleus wurde ebenfalls von Leichsenring et al. gezeigt. Doch wurden die Vakuolen weder auf Immunoreaktivität mit anderen molekularen Markern untersucht noch eine Hypothese für das Auftreten der Vakuolen in nicht-motorischen, insbesondere den dopaminergen Arealen geboten oder deren Relevanz für die ALS-Pathologie diskutiert.

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl andere, weit verbreitete Neuropeptide wie PACAP, VIP, Substanz P und Neuropeptid Y als auch verschiedene Marker für glutamaterge und inhibitorische Neurone untersucht, jedoch konnte in keinem Fall eine Immunoreaktivität mit den Vakuolen oder Anzeichen von Degeneration in den markierten Somata festgestellt werden. Ein kategorisches Kriterium für die Vulnerabilität bzw. Resistenz eines Areals bzw. Neuronentyps ließ sich auf der angewendeten, molekularen Basis allerdings nicht finden, da sowohl andere dopaminerge bzw. adrenerge (TH-positive) Areale als auch cholinerge bzw. CGRP-exprimierende Neurone von der Vakuolisierung ausgespart waren.

Zwar spricht die Tatsache, dass außer der G93A-Variante nur wenige SOD1-basierte Mausmodelle wie die G37R und D90A ebenfalls eine Vakuolisierung aufweisen (Wong et al., 1995, Jonsson et al., 2006), diese bei G85R, H46R sowie der G93A-Variante mit geringer Genkopienzahl aber ausbleibt (Bruijn et al., 1997, Dal Canto and Gurney, 1997, Sasaki et al., 2009) und auch bei Patienten kaum beobachtet wird, gegen eine allgemeine Relevanz der Vakuolisierung in der ALS-Pathogenese. Jedoch weisen alle Mausmodelle und eine Vielzahl von Patienten Schwellungen der Mitochondrien auf (Kong and Xu, 1998, Jaarsma et al., 2000, Higgins et al., 2003, Sumi et al., 2006, Sasaki et al., 2009), die nicht notwendiger Weise in eine Vakuolenbildung übergehen müssen (Jaarsma, 2006) und auch nicht zwingend zu einer Degeneration der betroffenen Neurone führen, wie am Beispiel sensorischer Neurone gezeigt (Guo et al., 2009). Diese Diskrepanzen zwischen Vakuolisierung und Neurodegeneration können nicht nur beim Vergleich der verschiedenen ALS-Modelle (z.B. SOD1-Mutation) beobachtet werden, sondern spiegeln sich auch im Muster der betroffenen Hirnareale im vorliegenden Mausmodell wider. So sind Mitochondrienpathologie und Vakuolisierung in der inferioren Olive bis ins Endstadium hinein nur gering (vergleiche auch Jaarsma 2000 und

2006) und auch in sensorischen Neuronen bleiben die Vakuolen klein und auf die Neuriten beschränkt und führen nicht zur Degeneration des gesamten Neurons (Guo 2009).

Die hier gemachte Beobachtung, dass die Vakuolisierung unterschiedlicher Areale verschieden stark auftritt, als auch die Hypothese dass stabile SOD1-Mutationen (G93A, D90A, G37R) eher zur Vakuolenbildung neigen, während instabile Mutationen (G85R, H46R) zur Bildung von zytoplasmatischen SOD1-Aggregaten führen (Sumi et al., 2006), sind starke Hinweise darauf, dass die SOD1-induzierte Neuronenschädigung in Abhängigkeit der Mutation einerseits und des betrachteten Neuronentyps andererseits auf unterschiedlichen Mechanismen beruht. Die Tatsache, dass einige Neurone/Areale nicht bzw. weniger von der Vakuolisierung betroffen sind, könnte sich auf einen Dosis-Effekt zurück führen lassen, da alle im Falle einer SOD1-Mutation von der Vakuolisierung betroffenen Areale wie Motoneurone oder die Substantia nigra auch im Wildtyp eine große Menge SOD1 exprimieren (Pardo et al., 1995, Bergeron et al., 1996). Außerdem führt die Überexpression von Wildtyp-SOD1 im Mausmodell ebenfalls und bemerkenswerter Weise sogar schneller zu motorischen Defiziten als die Expression einer geringen Genkopienzahl mutierter SOD1 (Wong et al., 1995, Jaarsma, 2006).

Dass auch in ALS-Patienten dopaminerge Neurone von der Degeneration betroffen sein können, ist lange bekannt (Tanaka et al., 1984, Wolf et al., 1991, Borasio et al., 1998), doch gilt dies nicht nur für Fälle der SOD1-basierten familiären ALS, sondern z.B. auch für Mutationen des TDP43 oder FUS (Nishihira et al., 2008, Miki et al., 2010, Tateishi et al., 2010). Außerdem zeigen ca. 23% der ALS-Patienten sowie verschiedene Mausmodelle Defizite in der Sensorik (Isaacs et al., 2007, Guo et al., 2009) und 30-50% der Patienten leiden unter frontotemporaler Demenz, was sich auf eine Schädigung kortikaler Strukturen zurückführen lässt (van der Graaff et al., 2009). Diese deutlich über dem Zufallsniveau liegenden Zahlen sprechen dafür, dass es sich bei der ALS entgegen der weit verbreiteten Annahme nicht um eine Erkrankung der Motoneurone, sondern um eine Multisystemerkrankung handelt (Zang et al., 2004, Isaacs et al., 2007, Geser et al., 2008, van der Graaff et al., 2009). Unabhängig der initialen molekularen Ursache eines ALS-Subtyps (z.B. einer SOD1- oder TDP43-Mutation) scheinen verschiedene Neurone, v.a. Moto- und dopaminerge Neurone, besonders vulnerabel und oft betroffen, während z.B. sensorische oder kortikale Neurone seltener geschädigt werden und andere Areale bzw. Neuronentypen generell resistent scheinen. In der vorliegenden Arbeit aufgezeigte Beispiele hierfür sind zum einen Thalamus und Kleinhirnkortex, außerdem konnten weder Vakuolen noch andere Zeichen der Degeneration in glutamatergen und inhibitorischen Neuronen oder eine Ko-Reaktivität der Vakuolen mit anderen Neuropeptiden außer CGRP gefunden werden.

Zu beachten ist außerdem, dass frühere Studien Schädigungen dopaminerger Areale vor allem bei den bulbären und damit progressiven Varianten der ALS bzw. erst nach langem, durch jahrelange künstliche Beatmung ermöglichtem Krankheitsverlauf beobachteten (Hayashi et al., 1991, Kato et al., 1995, Przedborski et al., 1996), während bei einer Untersuchung von 35 Patienten mit TDP43-Mutation keine Korrelation zum Alter bzw. Krankheitsdauer auftrat (Nishihira et al., 2008). Die Frage, welche Areale bzw. Neuronentypen unter welchen Umständen und welche primär und welche erst sekundär betroffen sind, bleibt also weiterhin offen.

Eine Ausweitung der hier durchgeführten Untersuchung mit genauerer zeitlicher Auflösung unter einer Gruppierung der Tiere nicht nach Alter, sondern nach Symptomstatus (eliminiert statistische Schwankungen im Krankheitsbeginn), sowie dem Einbezug sämtlicher (zentral)nervöser Strukturen (Ganglien etc.) könnte jedoch Aufschluss darüber geben und den exakten Phänotyp einer SOD1-basierten ALS-Erkrankung definieren. Vor allem die primäre Unterscheidung initial betroffener Neurone von solchen, die erst durch den Verlust ihrer Projektionsziele oder einer Schädigung durch das mit der Neuroinflammation entstehende toxische Milieu degenerieren, sollte auf dieser Basis möglich sein.

Bei der anschließenden Suche nach der Ursache der primären Vulnerabilität sollte jedoch von der Idee Abstand genommen werden, ein einziges, allgemein zutreffendes Kriterium finden zu können. Vielmehr gilt es, verschiedene Risikofaktoren auszumachen, die sowohl die vielen bekannten Ursachen der ALS einbeziehen als auch durch Akkumulation die unterschiedliche Vulnerabilität der Neuronentypen erklären. Diese Faktoren können sowohl anatomischer (z.B. lange Projektionen, vergleiche Jaarsma et al., 2000) als auch molekularer (hohe Expressionslevel von SOD1, TDP43, AMPA- und/oder NMDA-Rezeptoren, siehe 1.1.3.) oder physiologischer Natur (Kalziumpufferkapazität, siehe 1.1.3.) sein. Dieser Hypothese entsprechend würden Motoneurone deshalb grundsätzlich und zuerst degenerieren, weil sie die meisten Risikofaktoren auf sich vereinen (z.B. lange Projektionen, hohe SOD1-Expression, viele NMDA- und AMPA-Rezeptoren, geringe Kalziumpufferkapazität), während sensorische oder kortikale Neurone (z.B. lange Projektionen, aber geringe SOD1-Expression) nicht immer und Neurone ohne Risikofaktoren niemals von der ALS-Pathologie betroffen sind.

Analoge Untersuchungen an anderen Mausmodellen und humanen Geweben der familiären und sporadischen ALS könnten den genauen Phänotyp der bisher nur nach der auslösenden Ursache (z.B. SOD1- oder TDP43-Mutation) definierten Subtypen der ALS charakterisieren. Insbesondere für Diagnose und Prognose der jeweiligen ALS-Fälle sowie für die Entwicklung individueller, an den jeweiligen Subtypen angepassten Therapiemöglichkeiten, wie es z.B. auch in der Krebstherapie angestrebt wird, werden diese Erkenntnisse von großer Bedeutung sein.

4.1.1.2 Assoziation der CGRP-Vakuolen mit Astrozyten

Wie bereits im Rückenmark (Ringer et al., 2009) und der SOD1-basierten Studie im Gehirn (Leichsenring et al., 2006) festgestellt, konnte auch in hier eine räumliche und zeitliche Assoziation der Entstehung von CGRP-positiven Vakuolen mit der Astrozytenaktivierung beobachtet werden. Wie von Leichsenring et al. beschrieben, gibt es über den gesamten Zeitverlauf hinweg keine direkte Korrelation zwischen Anzahl oder Größe der Vakuolen und dem Ausmaß der Astrozytenaktivierung. So zeigten zwar die somatomotorischen Nuclei, der Nucleus ruber und das Periaquäduktale Grau bei früher und starker Vakuolisierung eine früh einsetzende und starke Aktivierung der Astrozyten, sowie Hypothalamus und Kortex eine moderate Aktivierung der Astrozyten bei moderater Vakuolenzahl und -größe. Doch fand sich z.B. in der Substantia nigra und dem Nucleus anterodorsalis des Thalamus trotz starker Vakuolisierung keine oder nur eine geringe Aktivierung der Astrozyten.

Eine erklärende Hypothese über diese schon lange bekannte Assoziation von Vakuolen und Astrozyten wurde auch in vorangegangenen Arbeiten nicht geboten (Levine et al., 1999, Leichsenring et al., 2006), doch ist gerade diesbezüglich die hier zum ersten Mal gezeigte Immunoreaktivität von CGRP möglicherweise von entscheidender Bedeutung. Es konnte zwar gezeigt werden, dass mutierte SOD1 in einer Chromogranin A-abhängigen Weise aktiv aus dem Motoneuron ausgeschleust wird und als Antigen dazu in der Lage ist, phagozytierende Mikroglia zu aktivieren (Urushitani et al., 2006). Es existiert jedoch kein Rezeptor, mit dem auch nicht-phagozytierende Astrozyten auf exportierte SOD1 reagieren könnten.

CGRP wird, wie alle Neuropeptide, in Chromogranin A-positiven Vesikeln aus der Zelle exportiert. Die Verschmelzung von CGRP-Chromogranin-Vesikeln könnte also sowohl an der Entstehung der Vakuolen als auch am Export der SOD1 beteiligt sein. Da Astrozyten den CGRP-Rezeptorkomplex exprimieren, könnte also nach dem aktiven Export von CGRP/SOD1/Chromogranin bzw. dem Freisetzen der CGRP/SOD1/Chromogranin-haltigen Vakuolen durch Degeneration des Neuriten eine Aktivierung der Astrozyten durch CGRP erfolgen (siehe 4.1.2.3.)

4.1.2 Die Rolle von CGRP im Krankheitsverlauf der ALS

4.1.2.1 CGRP als Markerprotein für die Vulnerabilität der Motoneuronen

In der vorliegenden Arbeit konnten im Wildtyp anhand der CGRP-Expression drei verschiedene Typen von Motoneuronen definiert werden: Motoneurone mit starker CGRP-Expression (*highCGRP*), solche mit schwacher CGRP-Expression (*lowCGRP*) und solche ohne CGRP-

Expression (*nonCGRP*). Durch die Verwendung von Isoform-spezifischen Sonden in der *in situ*-Hybridisierung sowie Gewebe von Mäusen mit einer Deletion der α - bzw. β CGRP-Isoform konnte dieses Muster primär auf die Expression von α CGRP zurückgeführt werden. β CGRP zeigte auf mRNA-Ebene über alle Motoneuronen hinweg eher ausgeglichene, niedrige Expressionslevel, die im α CGRP-defizienten Tier mit kaum detektierbaren Proteinmengen korrelierten.

Die drei Motoneuronentypen waren prinzipiell in allen somatomotorischen Nuclei sowie im Rückenmark zu finden, doch zeigten die Areale deutliche Unterschiede in den jeweiligen Anteilen der Neuronentypen, so dass sich ebenfalls drei Gruppen definieren ließen: Die oculomotorische Gruppe bestehend aus Ncl. oculomotorius, Ncl. trochlearis und Ncl. abducens mit einem überwiegenden Anteil an *nonCGRP*-Neuronen (80-100%), die faciale Gruppe bestehend aus Ncl. motorius nervi trigeminalis, Ncl. facialis und Ncl. hypoglossus mit circa gleichen Anteilen aller drei Motoneuronentypen, und schließlich die spinomedulläre Gruppe bestehend aus dem Ncl. ambiguus und dem Rückenmark mit einem überwiegenden Anteil von *highCGRP*-Neuronen (80-90%).

Im SOD1-Mausmodell zeigte sich im Zeitverlauf, dass *highCGRP*-Motoneurone früher und zu einem größeren Anteil degenerieren als *lowCGRP*-Neurone, während *nonCGRP*-Neurone bis zum Endstadium resistent scheinen, und zwar unabhängig davon, in welchem Nucleus sich die jeweiligen Motoneurone befinden. Vielmehr resultierte die Vulnerabilität eines Nucleus aus seinem Anteil an (*high*)CGRP-Motoneuronen bzw. die Resistenz gegenüber der ALS-Pathologie, insbesondere der oculomotorischen Gruppe, an ihrem Anteil an *nonCGRP*-Motoneuronen. Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass i) je höher die CGRP-Expression im Einzelneuron, desto höher ist die Vulnerabilität des Motoneurons und ii) je höher der Anteil CGRP-exprimierender Motoneurone, desto höher ist die Vulnerabilität des jeweiligen Nucleus. Neurone und Nuclei ohne CGRP-Expression scheinen gegenüber der ALS-Pathologie resistent.

Diese Ergebnisse stehen sowohl in Einklang mit früheren Beobachtungen, die im Ncl. facialis der Ratte eine vergleichbare Einteilung der Motoneuronen anhand ihrer CGRP-Expression vornahmen (Behzadi and Ganji, 2005), als auch einer Studie, die in postmortalem Rückenmarksgewebe von ALS-Patienten keine CGRP-exprimierenden Motoneurone mehr nachweisen konnte (Gibson et al., 1988b). Außerdem stellen sie einen Zusammenhang her zu der Beobachtung, dass im Krankheitsverlauf der ALS sowohl in der Maus als auch im Menschen die schnellen, ermüdenden Muskelfasertypen (*fast-twitch fatiguable*, FF) zuerst von der Denervierung betroffen sind, während ermüdungsresistente (*fast-twitch fatigue-resistant*, FR) und langsame Muskelfasern (*slow-twitch fatigue-resistant*, SR) erst später betroffen sind (Frey et

al., 2000, Pun et al., 2006, Piotrkiewicz and Hausmanowa-Petrusewicz, 2011). Während dies von einer neueren Studie allein mit der enormen Größe der motorischen Einheit, Axondurchmesser und Soma des die FF-Muskelfasern innervierenden Motoneurons und dem damit einhergehenden energetischen Mehraufwand erklärt wird (Hegedus et al., 2007), ist schon länger bekannt, dass FF-Muskelfasern vor allem von CGRP-exprimierenden Motoneuronen innerviert werden (Piehl et al., 1993). Entsprechend kann geschlussfolgert werden, dass die hier beschriebene frühe Degeneration der *highCGRP*-Neurone in Hirnstamm und Rückenmark mit der frühen Denervierung der durch sie innervierten FF-Muskelfasern korreliert (vergleiche dazu 4.1.2.4.)

Zudem bestätigte eine umfassende Genexpressionsanalyse die Ergebnisse dieser Arbeit, indem im Ncl. hypoglossus eine 17,4fach höhere Expression von α CGRP nachgewiesen wurde als im Ncl. oculomotorius (Hedlund et al., 2010). Wie in allen bisherigen Studien zu Unterschieden zwischen resistenten und vulnerablen Motoneuronen, z.B. bezüglich des Rezeptorbesatzes (Lorenzo et al., 2006, Ma et al., 2006, Fuchs et al., 2010) oder der Kalziumpufferkapazität (Vanselow and Keller, 2000, Obal et al., 2006, Panov et al., 2011) wurden jedoch auch von Hedlund et al. die oculomotorischen Kerne als resistent den restlichen somatomotorischen Kernen gegenüber gestellt, ohne dass eine differenzielle Betrachtung einzelner Motoneurone erfolgte. Eine Analyse der Einzelneurone wie in dieser Arbeit vorgenommen ist neu und ein Marker für die Vulnerabilität eines bestimmten Motoneuronentyps wird zum ersten Mal beschrieben. Im Gegensatz zu den oben genannten Studien erfolgte hier ebenfalls nicht nur die Aufstellung einer Hypothese durch Analyse z.B. des Expressionsverhaltens der Motoneurone im Wildtyp, sondern auch die Überprüfung der Hypothese im SOD1-Mausmodell.

Eine frühere Studie konnte zeigen, dass im Affen 80-100% der Neurone oculomotorischer Nuclei das kalziumchelatierende Protein Parvalbumin exprimieren, während nur ca. ein Drittel der Neurone anderer somatomotorischer Nuclei eine Parvalbumin-Expression aufwiesen (Reiner et al., 1995). Diese Zahlen entsprechen den jeweiligen Anteilen von *nonCGRP*-Motoneuronen, sodass spekuliert werden könnte, dass mit Parvalbumin ein molekularer Marker für ALS-resistente und mit CGRP ein Markerprotein für ALS-vulnerable Motoneuronen existiert. In der Ratte findet sich jedoch keine Parvalbumin-Expression im Nucleus hypoglossus (Laslo et al., 2000), obwohl in entsprechenden SOD1-transgenen Modellen auch bei dieser Spezies nicht alle Motoneuronen dieses Kerns degenerieren. In der vorliegenden Arbeit konnte auch in der Maus keine Parvalbumin-Expression in den Nuclei der facialis Gruppe nachgewiesen werden. Parvalbumin als Marker für resistente Motoneurone ist also (zumindest im murinen Organismus) nicht absolut. Gleiches gilt auf den ersten Blick auch für CGRP als Marker für vulnerable Motoneurone, da auch im Endstadium 50% der *lowCGRP*- und

20% der *high*CGRP-Motoneurone keine Anzeichen der Degeneration aufwiesen. Doch ist nicht ausgeschlossen, dass bei einem längeren Krankheitsverlauf z.B. bei künstlicher Beatmung, die in Versuchstieren nicht durchgeführt wurde, eine vollständige Degeneration CGRP-exprimierender Motoneurone auftritt. Eine Eignung von CGRP als molekularer Biomarker für ALS-vulnerable Neurone sollte dementsprechend an humanem Gewebe, insbesondere von ALS-Patienten mit durch künstliche Beatmung ermöglichtem langen Krankheitsverlauf sowie nicht-SOD1-basierter Pathologie, überprüft werden.

Eine direkt ursächliche Rolle von CGRP an der Vulnerabilität des exprimierenden Motoneurons wäre durch Interaktion mit mutierter SOD1 und die anschließende Induktion der Vakuolisierung der Mitochondrien durch Fusion mit den Neuropeptid-Vesikeln denkbar. Dies würde die Hypothese einer früheren Studie bestätigen, die in Fällen der fALS höhere Mengen CGRP in spinalen Motoneuronen beobachtete als in Fällen der sALS und dies mit einer Stauung des axonalen Transports der CGRP-Vesikel in Abhängigkeit einer SOD1-Mutation erklärte (Kato et al., 1991).

Da eine solche Interaktion jedoch vermutlich nicht über CGRP, sondern durch Chromogranin vermittelt wäre (Urushitani et al., 2006), aber wie in dieser Arbeit nachgewiesen nicht alle CGRP-exprimierenden Neurone von der Vakuolisierung der Mitochondrien betroffen sind, erscheint ein solcher Mechanismus unwahrscheinlich. Außerdem zeigten andere Neuropeptide, die ebenso in Chromogranin-Vesikeln transportiert werden, keine Kolo-kalisation mit den SOD1-Vakuolen. Desweiteren wurde gezeigt, dass die Definition der Motoneuronentypen und damit auch ihre Vulnerabilität hauptsächlich von der Expression von α CGRP abhängt; eine Deletion dieser Isoform führte im SOD1-Mausmodell jedoch nicht zu einer Veränderung der klinischen Symptomatik. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich die beiden Isoformen im Fall einer Deletion gegenseitig in ihrer Funktion ersetzen. Zwar war β CGRP im α CGRP-defizienten Tier nur äußerst gering exprimiert, doch könnten selbst diese Mengen ausreichen, um bei einem Export die entsprechenden Effekte in rezeptortragenden Zielzellen auszulösen. Außerdem wurde nicht überprüft, ob im SOD1-transgenen α CGRP-defizienten Tier die Expression von β CGRP als Reaktion auf die ALS-Erkrankung reguliert wurde.

Tatsächlich konnte für die Deletion der CGRP-Rezeptorkomponente RAMP1 im SOD1-Mausmodell ein Effekt auf den Krankheitsverlauf nachgewiesen werden, doch beschränkte dieser sich in der histologischen Untersuchung auf die Reduktion der Neuroinflammation (vergleiche 4.1.3). Das Degenerationsverhalten der Motoneurone, insbesondere der Unterschied zwischen den überwiegend resistenten Motoneuronen der oculomotorischen Nuclei und den restlichen somatomotorischen Arealen, war hingegen unverändert. Die Voraussetzung für eine solche extrazelluläre Wirkung von CGRP direkt auf die Motoneuronen setzt

allerdings auch die Expression von CGRP-Rezeptoren voraus, die in dieser Arbeit für Motoneuronen generell nicht nachgewiesen werden konnte. Eine ursächliche Wirkung über neurotoxische Zytokine, deren Ausschüttung durch Gliazellen von CGRP induziert werden könnte, setzt ebenfalls voraus, dass vulnerable und resistente Motoneuronen sich auch in ihrer Rezeptorexpression unterscheiden. Schließlich liegen *nonCGRP*- und *highCGRP*-Motoneurone v.a. in den Nuclei der facialis Gruppe direkt benachbart, so dass sich die Wirkung von Zytokinen lokal nicht auf die CGRP-exprimierenden Neuronen beschränken würde, sich eine unterschiedliche Vulnerabilität bzw. Resistenz gegenüber dem inflammatorischen Milieu also nur durch unterschiedliche Rezeptoren erklären ließe.

Gerade bezüglich der Aufklärung anderer molekularer und physiologischer Unterschiede zwischen resistenten und vulnerablen Motoneuronen bietet CGRP als Markerprotein eine äußerst wichtige Grundlage. Durch eine immunhistochemische Markierung mit CGRP könnten für zukünftige Genexpressions- oder elektrophysiologische Untersuchungen vulnerable und resistente Motoneurone auf Einzelzelebene voneinander unterschieden und damit präzisere Ergebnisse geliefert werden als die bisherigen angewandten Vergleiche zwischen Ncl. oculomotorius/trochlearis und Ncl. hypoglossus/facialis. Sollten die Voraussetzungen der jeweiligen Versuche eine vorangehende immunhistologische Färbung nicht erlauben, empfiehlt sich aufgrund der vorliegenden Ergebnisse zur Verteilung der Motoneurontypen in den einzelnen Nuclei der Wechsel auf einen Vergleich zwischen Ncl. abducens und Ncl. ambiguus. Aufgrund der gegenüber anderen somatomotorischen Nuclei relativ geringen Zellzahl in bisherigen Studien meist ausgelassen, eignen sich diese beiden Areale aufgrund der fast reinen Zusammensetzung aus resistenten (Ncl. abducens: ca. 95% *nonCGRP*) bzw. vulnerablen Motoneuronen (Ncl. ambiguus: ca. 85% *highCGRP*) wesentlich besser zur Aufklärung der ursächlichen Unterschiede.

Die Frage, ob CGRP eventuell doch direkt durch intrazelluläre Komplikationen mit der SOD1-Mutation und damit Rezeptor-unabhängig an der Vulnerabilität der Motoneuronen beteiligt ist, ließe sich durch eine Zusammenkreuzung der α CGRP- und β CGRP-defizienten Mausstämmen mit dem SOD1-Mausmodell beantworten.

4.1.2.2 CGRP als Signal neuronaler Schädigung

Vorangegangene Studien konnten zeigen, dass CGRP als Reaktion auf verschiedene Arten neuronaler Schädigung wie z.B. Axotomie, periphere Inflammation sowie Infektion mit Borna- oder Rabies-Viren von sensorischen, motorischen und kortikalen Neuronen reguliert bzw.

induziert wird (Weihe et al., 1995, Sarasa et al., 1996, Fukuoka et al., 1999, Rohrenbeck et al., 1999, Snyder et al., 2002, Weihe et al., 2008). Entsprechend wurde CGRP als ein unspezifisches, zentrales Signal neuronaler Schädigung zur trophischen Unterstützung der geschädigten Neurone sowie zur Induktion von Reparatur- und Regenerationsmechanismen angenommen (Reddington et al., 1995). Eine Regulation von CGRP in den ALS-geschädigten Motoneuronen konnte in den SOD1-transgenen Mäusen jedoch zu keinem der untersuchten Zeitpunkte festgestellt werden. Ob bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie dem Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson eine CGRP-Induktion in den betroffenen Neuronen erfolgt, ist nicht bekannt.

Trotz der fehlenden Regulation ist nicht ausgeschlossen, dass CGRP auch in der ALS als zentrales, z.B. an Gliazellen gerichtetes Signal fungiert, da Motoneuronen (im Gegensatz zu z.B. kortikalen Neuronen, Rohrenbeck et al., 1999, Weihe et al., 2008) auch im gesunden Zustand eine große Menge an CGRP exprimieren, das Peptid eventuell jedoch nur an der neuromuskulären Endplatte ausschütten, während sie im Fall einer Schädigung auch an Soma und Dendriten neuropeptidhaltige Vesikel exportieren. Genaue Exportmechanismen für Neuropeptide und andere Signalstoffe bzw. vor allem die Frage der Sortierung zwischen axonalem und dendritischem Export sind zwar noch nicht aufgeklärt (Ramirez and Couve, 2011, Ramirez et al., 2011). Doch dürfte allein die Tatsache, dass Gliazellen Rezeptoren für Neuropeptide wie CGRP und PACAP exprimieren, als Beweis angesehen werden, dass Mechanismen existieren, über die Neuropeptide auch in den Interstitialraum des ZNS abgegeben werden können, um im Anschluss eine Reaktion der Glia zu induzieren.

4.1.2.3 CGRP als Modulator der Neuroinflammation

Bei der Einkreuzung der RAMP1-Defizienz in das SOD1-Mausmodell zeigte sich in der klinischen Symptomatik ein früherer Beginn der Erkrankung bezüglich der Kraftausdauer in der Hinterpfote, im Anschluss aber ein langsamerer Krankheitsverlauf, sodass sich keine Unterschiede in der Überlebensrate von RAMP1-kompetenten und RAMP1-defizienten SOD1-transgenen Tieren ergaben. Histologisch korrelierten diese Veränderungen mit einer frühen Denervierung der neuromuskulären Endplatten und früher Degeneration der Motoneurone im Rückenmark sowie einer generellen Reduktion der Neuroinflammation. Sowohl in der früh-symptomatischen Phase als auch im Endstadium zeigten RAMP1-defiziente Tiere eine geringere Aktivierung der Astrozyten und eine Infiltration von Lymphozyten blieb bis ins Endstadium hinein weitgehend aus.

Diese Ergebnisse stehen einerseits im Einklang mit früheren Studien, die nachweisen konnten, dass CGRP sowohl in Astrozyten als auch Mikroglia durch Induktion verschiedener *immediate early genes* wie c-jun und c-fos zur Aktivierung führt (Haas et al. 1991, Priller et al. 1995). Während diese CGRP-induzierte Aktivierung bei Astrozyten zu morphologischen Veränderungen führt (Lazar et al. 1991), hemmt CGRP in Mikroglia die Antigenpräsentation (Yaraee et al., 2005). Auch humane und murine Lymphozyten exprimieren sowohl CGRP als auch den Rezeptorkomplex (Umeda and Arisawa, 1989, McGillis et al., 1991, Wang et al., 1999, Wang et al., 2002). Eine Stimulation mit CGRP führt hier zur Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF α sowie zur Inhibition der mitogenstimulierten Proliferation (Cuesta et al., 2002, Gomes et al., 2005, Antunez et al., 2009). Obwohl die Mikroglia in RAMP1-defizienten Tieren bezüglich Anzahl und Morphologie keine Unterschiede zu RAMP1-kompetenten SOD1-transgenen Tieren aufwiesen, ist nicht ausgeschlossen, dass auch sie durch die RAMP1-Deletion und damit die fehlende Stimulation durch CGRP weniger aktiviert sind, also z.B. weniger Zytokine exprimieren.

Andererseits bestätigen diese Ergebnisse auch die These, dass in der ALS-Pathologie die erste Phase der Neuroinflammation neuroprotektive Wirkung auf die Motoneuronen hat, diese in späteren Krankheitsphasen jedoch in ein neurotoxisches Milieu umschlägt. Da RAMP1-defiziente Tiere in der frühen Krankheitsphase eine geringere Aktivierung v.a. der Astrozyten aufweisen, fehlt hier die neuroprotektive Komponente der Inflammation, durch die sich eventuell der frühere Krankheitsbeginn erklärt. Dementsprechend wäre die anschließende Verlangsamung der klinischen Symptomatik RAMP1-defizienter Tiere auf einen verzögerten Umschlag der Neuroinflammation ins Neurotoxische zurückzuführen, der im RAMP1-kompetenten Tier ebenfalls durch CGRP verstärkt wird. Der Grund hierfür könnte vor allem in der reduzierten Interaktion zwischen Mikroglia und Lymphozyten liegen. In aktiviertem Zustand produzieren beide proinflammatorische Zytokine, durch die sie sich gegenseitig in einem sich selbst verstärkenden Kreislauf stimulieren (siehe 1.1.4.). Da CGRP die Expression proinflammatorischer Zytokine verstärkt, ist anzunehmen, dass diese unter der RAMP1-Deletion schwächer ausfällt und die Neuroinflammation insgesamt, vor allem aber die neurotoxische Wirkung von M1-Mikroglia und T-Killerzellen, weniger aggressiv ist als in RAMP1-kompetenten Tieren. Die Tatsache, dass Lymphozyten den CGRP-Rezeptor exprimieren und die hier gemachte Beobachtung, dass die Infiltration CD3-positiver Zellen unter der RAMP1-Deletion ausbleibt, könnte ein Hinweis darauf sein, dass von Neuronen ausgeschüttetes CGRP sogar eine direkte Rolle bei der Rekrutierung peripherer Immunzellen ins ZNS spielt.

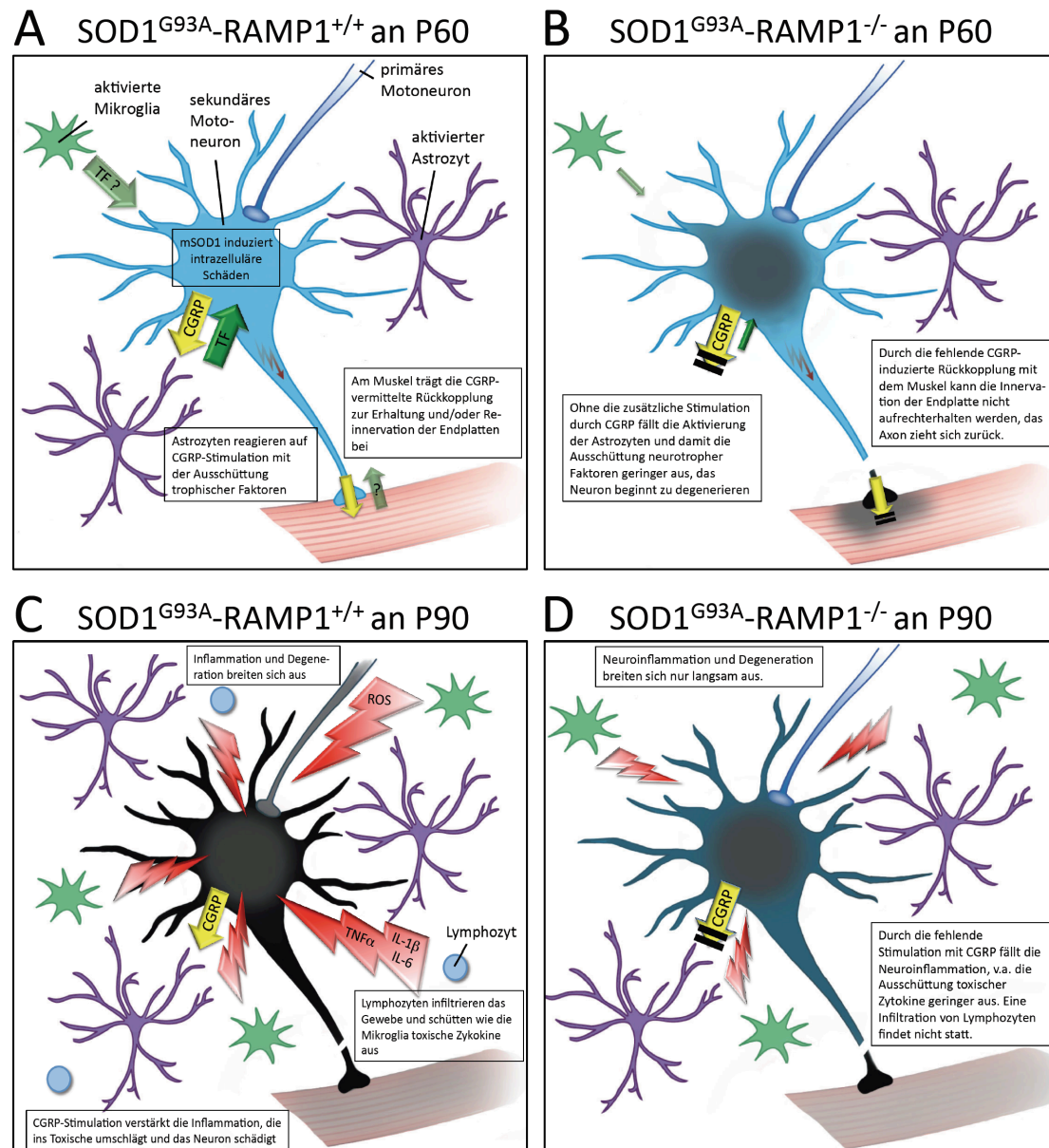


Abb. 4.1.2.: Systematische Darstellung der Effekte einer RAMP1-Deletion im SOD1-Mausmodell. (A) Nach der Induktion intrazellulärer Schädigung durch mutierte (m)SOD1 kommt es an P60 zu einer Aktivierung der Gliazellen, die durch die Ausschüttung trophischer Faktoren (TF) das Neuron protegieren. Das von dem Motoneuron ausgeschüttete CGRP verstärkt diesen Effekt in Astrozyten (und Mikroglia?). Außerdem trägt CGRP durch noch unbekannte Mechanismen zur Aufrechterhaltung der neuromuskulären Endplatte bei. **(B)** Bei einer Unterbindung des CGRP-Signalwegs durch die RAMP1-Deletion fällt die Gliaaktivierung und damit die Protektion des Neurons geringer aus, durch die intrazelluläre Schädigung und die fehlende CGRP-induzierte Rückkopplung mit dem Muskel zieht sich das Axon von der Endplatte zurück. **(C)** In der Spätphase der Erkrankung kommt es zur (eventuell direkt CGRP-vermittelten) Rekrutierung von Lymphozyten und die Neuroinflammation schlägt u.a. durch die Ausschüttung von *Reactive oxygene species* (ROS) ins Neurotoxische um. CGRP verstärkt dabei die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie TNFα, IL-1b und IL-6, die das Neuron schädigen können. Es kommt zum Untergang des Motoneurons und durch eine Ausbreitung der Inflammation bzw. Verlust der Projektionsziele zu einer Progression der Degeneration in benachbarte bzw. höhere Areale. **(D)** Durch die fehlende Stimulation mit CGRP fällt die Neuroinflammation, vor allem die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, im RAMP1-defizienten Tier auch in der Spätphase der Erkrankung geringer aus, eine Lymphozyteninfiltration findet nicht statt. Entsprechend verläuft die Degeneration des Motoneurons und die Progression in andere Gehirnbereiche langsamer als in RAMP1-kompetenten Tieren. © Kathie Ris (Grundkonstellation der Zelltypen) und Cornelia Ringer (funktionelle Aspekte).

4.1.2.4 CGRP als Signalmolekül an der Muskelfaser

Bei der Einkreuzung der RAMP1-Deletion in das SOD1-Mausmodell zeigte sich im PaGE-Test ein früherer Beginn der Erkrankung sowie ein anschließend langsamerer Verlauf. Die beiden anderen motorischen Test sowie die Entwicklung des Körpergewichts zeigten jedoch weder im Vergleich von Tieren desselben Alters noch nach Angleichung der individuellen Symptomstarts eine Differenz zwischen RAMP1-kompetenten und –defizienten Tieren. Während RAMP1-kompetente Tiere zeitgleich mit dem Beginn der PaGE-Symptomatik an Gewicht verloren und eine Reduktion der Maximalkraft der Vorderpfote zeigten, setzten bei RAMP1-defizienten Tieren Gewichtsverlust und Defizite der Maximalkraft erst ca. 30 Tage nach dem Beginn der PaGE-Symptomatik ein. Bezüglich des Gewichtsverlusts lässt sich diese Beobachtung dadurch erklären, dass sich die Tiere zu Beginn der PaGE-Symptomatik am postnatalen Tag (P) 50 noch im Wachstum befinden und die damit einhergehende Gewichtszunahme den Gewichtsverlust aus der eventuell bereits einsetzenden Atrophie der Muskulatur übersteigt. Für den Griffstärke-Test kommt eine solche Erklärung nicht in Frage, zumal sich der *Musculus triceps* (Vorderpfote) bezüglich der Anzahl verbleibender Endplatten-Cluster (motorische Einheiten) pro mm² Muskel sowie dem Anteil bereits denervierter Endplatten nicht vom *Musculus quadriceps* (Hinterpfote) unterschied. In beiden Muskeln fand sich bei RAMP1-defizienten Tieren sowohl an P60 als auch P90 eine wesentlich stärkere Reduktion der Endplattenanzahl und –innervation als bei RAMP1-kompetenten Tieren. Histologisch betrachtet setzte die Symptomatik also in beiden Muskeln gleichzeitig und früher ein als bei RAMP1-kompetenten Tieren, klinisch wird dies jedoch nur durch den PaGE-Test widergespiegelt. Dieser testet eher Kraftausdauer, während der Griffstärketest eher von der Maximalkraft abhängig ist.

Einerseits konnten mehrere Studien an der Maus und am Menschen zeigen, dass im Zuge der ALS-Pathologie tendenziell zuerst die ermüdbaren schnell-zuckenden (*fast-twitch-fatiguable*, FF), dann die ermüdungsresistenten Schnelldkraftfasern (*fast-twitch-fatigue-resistant*, FR) und zuletzt die langsamen Muskelfasern (*slow-twitch-fatigue-resistant*, SR) denervierte Endplatten aufweisen (Pun et al., 2006, Piotrkiewicz and Hausmanowa-Petrusewicz, 2011). Andererseits exprimiert nur eine Subpopulation der Motoneurone CGRP (siehe 4.1.2.), wobei diese hauptsächlich FF- und FR-Fasern innervieren, umgekehrt allerdings nur ca. ein Drittel der FF- und FR-Fasern von CGRP-exprimierenden Motoneuronen innerviert sind (Forsgren et al., 1993, Piehl et al., 1993). Es kann also weder mit Sicherheit gesagt werden, welche Muskelgruppen bzw. Muskelfasertypen entscheidend für die Leistungsfähigkeit eines Tieres im PaGE- bzw. Griffstärketest sind, noch welche dieser Muskelfasern von CGRP-exprimierenden Motoneuronen innerviert sind und welche nicht. Folglich lässt sich spekulie-

ren, dass CGRP in einem bestimmten Typ an Muskelfasern (der nicht notwendigerweise mit der FF-, FR- und SR-Einteilung übereinstimmen muss) eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung der neuromuskulären Kopplung spielt und diese Muskelfasern die Leistung im PaGE-Test bestimmen. Demzufolge würde es sich bei den denervierten Endplatten im M.triceps um denselben Muskelfasertyp handeln wie im M.quadriceps, doch ist dieser für die Leistung im Griffstärketest nicht ausschlaggebend.

Grundlage dieser Hypothese sind Studien, die CGRP eine wichtige Rolle bei der Ausbildung der neuromuskulären Endplatte während der Entwicklung zuschreiben (Gibson et al., 1984, New and Mudge, 1986). Da nicht-SOD1-transgene RAMP1-defiziente Tiere keine motorischen Defizite zeigten, scheint diese Funktion von CGRP jedoch nicht essentiell zu sein, sondern erst im Schadensfall zum tragen zu kommen. Neben der ALS könnte dies auch bei einer Axotomie der Fall sein. Die Tatsache, dass CGRP in motorischen (und sensorischen) Neuronen nach Axotomie stark hochreguliert wird (Sarasa et al., 1996, Fukuoka et al., 1999, Snyder et al., 2002), spricht zumindest dafür, dass CGRP eine wichtige Rolle in der in diesem Fall stattfindenden Reinnervation des Muskels spielt. Eine Überprüfung dieser These durch die Axotomie an RAMP1-defizienten Tiere wurde jedoch noch nicht durchgeführt.

4.1.3 Therapeutisches Potential von CGRP-Antagonisten in der ALS

Die Deletion von RAMP1 und damit die Unterbindung der CGRP-Signalkaskade hatte im Mausmodell zwei Effekte: Zum einen resultierte sie in einen früheren Beginn der klinischen Symptomatik, zum anderen verlangsamte sie jedoch die Progression der Erkrankung. Wie bereits unter 1.1.5. dargelegt, spielt eine Verschiebung des Krankheitsbeginns bezüglich therapeutischer Potenziale eines Medikaments keine Rolle, da dieser im Patienten vor der Diagnose stattgefunden hat und damit außerhalb jeglicher therapeutischer Maßnahmen liegt. Eine Unterbindung des CGRP-Signalwegs nach Krankheitsbeginn könnte also auch beim Menschen zu einer Verlangsamung der Krankheitsprogression führen.

Bisher bekannte CGRP-Antagonisten wie BIBN4096 (*Olcegepant*) oder MK-0974 (*Telcagepant*), die sich bereits in klinischen Studien zur Migränetherapie befinden, sind jedoch kaum bluthirnschrankengängig (Edvinsson, 2007, 2008). Die bisher praktizierte orale oder intravenöse Gabe würde folglich zwar die im Blut befindlichen Lymphozyten erreichen und eventuell deren Penetration in das ZNS hemmen, Astrozyten und Mikroglia hingegen würden nicht erreicht. Alternativ käme eine intranasale Applikation in Frage, bei der über den Riechnerv ein direkter Zugang zur Cerebralflüssigkeit besteht. Unter Umständen wäre eine Penetration der Antagonisten durch die hirnschrankenfreien circumventrikulären Organe in die interstitielle Flüssigkeit und damit das Erreichen von Astrozyten und Mikroglia möglich, doch setzt

das eine lange Halbwertszeit der jeweiligen Substanz voraus, da weite Strecken über Diffusion zurückgelegt werden müssten. Ob die für die vorhandenen Antagonisten ermittelten Werte von ca. 2h für *Olcegepant* (Edvinsson, 2005, Link et al., 2008) und 2-9h für *Telcagepant* (Edvinsson and Linde, 2010, Han et al., 2010) dafür ausreichend sein könnten, ist unbekannt. Beachtet werden muss zudem, dass es sich bei CGRP um ein pleiotropisches Neuropeptid mit vielerlei Funktionen handelt, sodass bei einer peripheren, zentralen oder gar systemischen Antagonisierung des CGRP-Signalweges mit entsprechenden Nebenwirkungen zu rechnen ist.

Umso wichtiger ist es, die genauen Effekte von CGRP auf die einzelnen beteiligten Zelltypen, d.h. Astrozyten, Mikroglia und Lymphozyten und die durch CGRP angestoßenen Signalkaskaden, z.B. die Induktion von Expression und Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen aufzuklären. Eventuell finden sich in diesen Interaktionen konkretere Möglichkeiten eines therapeutischen Ansatzes. Alternativ wäre auch eine Aufklärung des Mechanismus, über den CGRP aus den Motoneuronen in den Interstitialraum exportiert wird, von großer Bedeutung, um auch an dieser Stelle Möglichkeiten zur therapeutischen Intervention zu identifizieren.

4.2 Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide

Wie CGRP ist auch PACAP ein pleiotropes Neuropeptid mit Funktionen unter anderem in der Neuroprotektion und Inhibition von peripherer und zentraler Inflammation. Mit dem eng verwandten *Vasoaktiven intestinalen Peptid* (VIP) teilt PACAP sich die beiden Rezeptoren VPAC1 und VPAC2, verfügt außerdem aber über den spezifischen Rezeptor PAC-1, durch den vor allem die neuroprotektiven Effekte an Neuronen, Astrozyten und Mikroglia über Anstoß der cAMP-Signalkaskade vermittelt werden.

Es ist bereits bekannt, dass PACAP in der Lage ist, Motoneuronen *in vitro* gegen glutamatin-duzierte Erregungstoxität, einem auch in der ALS beschriebenen Pathogenesemechanismus, zu schützen (Tomimatsu and Arakawa, 2008). Zudem wurden bei *in vivo*-Modellen von Axotomie, Ischämie und Morbus Parkinson neuroprotektive Effekte von endogenem und/oder exogen appliziertem PACAP beobachtet (Chen et al., 2006, Reglodi et al., 2006b, Armstrong et al., 2008). Mit dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob endogenes PACAP auch im Mausmodell der ALS eine neuroprotektive Rolle spielt und sich ein Eingriff in den PACAP-Signalweg als Therapie der ALS im Menschen eignen könnte.

4.2.1 Veränderung der PACAP-Expression als Reaktion auf neuronale Schädigung

Wie CGRP wird auch PACAP in vielen Fällen neuronaler Schädigung induziert bzw. hochreguliert (für eine Übersicht siehe Zigmond and Sun, 1997), so auch in Motoneuronen nach Axotomie (Zhou et al., 1999, Armstrong et al., 2003). In Übereinstimmung mit den Beobachtungen von Armstrong et al. konnte auch in dieser Arbeit in den gesunden Motoneuronen des Ncl. facialis von Wildtyptieren weder auf Protein- noch mRNA-Ebene eine PACAP-Expression nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu der im Fall der Axotomie generellen Induktion der PACAP-Expression in allen Motoneuronen (Armstrong et al., 2003, Wainwright et al., 2008), wurde im vorliegenden Fall der ALS nur in einigen wenigen Einzelneuronen der somatomotorischen Nuclei eine Induktion von PACAP beobachtet. Neben der äußerst geringen Anzahl PACAP-exprimierender Neurone war ebenfalls bemerkenswert, dass sowohl in der Immunhistochemie als auch der *in situ*-Hybridisierung nicht alle PACAP-positiven Zellen eine Ko-Immunoreaktivität für die Markerproteine ChAT bzw. VACHT aufwiesen. Es handelte sich also nicht nur um Motoneurone, sondern auch Neurone anderer Identität. Eine Regulation der Rezeptoren, insbesondere des PAC-1, dessen Expression nach Axotomie in Motoneuronen deutlich reduziert wird (Armstrong et al., 2003), war ebenfalls nicht zu beobachten:

SOD1-transgene Tiere zeigten in Früh- und Endstadium der ALS-Erkrankung in den somatomotorischen Nuclei eine gegenüber dem Wildtyp unveränderte, moderate PAC-1-Expression. Bezüglich dieser Regulationsmechanismen scheint sich die ALS als eine chronische Schädigung der Motoneurone also grundsätzlich von einer akuten Verletzung wie der Axotomie zu unterscheiden.

4.2.2 Verzögerung des Krankheitsverlaufes SOD1-transgener Tiere durch PACAP-Deletion

Um zu überprüfen, ob die Veränderung der endogenen PACAP-Expression bzw. PACAP allgemein einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf der ALS hat, wurde ein PACAP-defizienter Mausstamm in das SOD1-Mausmodell eingekreuzt und somit die Signalkaskade systemisch unterbrochen. Unter der Annahme, dass PACAP neuroprotektive Funktionen direkt an den Motoneuronen und/oder durch Modulation der Neuroinflammation hat, war unter der PACAP-Deletion ein beschleunigter Krankheitsverlauf zu erwarten. PACAP-defiziente Tiere zeigten mit knapp 140 Tagen jedoch eine höhere Lebenserwartung als PACAP-kompetente Tiere mit 132 Tagen. Im Fall der ALS bzw. im SOD1-Mausmodell scheint endogenes PACAP also keinen protektiven, sondern einen destruktiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf zu nehmen.

4.2.3 Auswirkungen der PACAP-Deletion auf die Motoneuronendegeneration

Der klinische Verlauf der Symptomatik bezüglich Entwicklung des Körpergewichts, der Kraftausdauer der Hinterpfote sowie der Maximalkraft der Vorderpfote war bei PACAP-defizienten Tieren unverändert, lediglich im Lecktest zeigten sie in der Endphase der Erkrankung eine verbesserte Performanz der Zunge im Vergleich zu PACAP-kompetenten SOD1-transgenen Tieren. Doch könnte diese Tatsache ausreichend sein, um die relativ geringe Verbesserung der Lebenserwartung von ca. 5,5% zu erklären. Im Mausmodell hängt die Lebenserwartung der ALS-kranken Tiere vor allem davon ab, wie lange sie bei fortschreitender Lähmung noch in der Lage sind, sich selbstständig mit Nahrung und Wasser zu versorgen, und dafür ist schließlich eine bessere Funktion der Zunge von entscheidender Bedeutung.

Zwar konnte in dem für die Zungenmotorik verantwortlichen Ncl. hypoglossus keine Reduktion des Motoneuronenverlusts festgestellt werden, doch fand die Untersuchung auf rein morphologischer Basis statt. Entsprechend ist nicht ausgeschlossen, dass bei PACAP-

kompetenten Tieren einige der verbliebenen Motoneuronen des Ncl. hypoglossus zwar noch eine gesunde Morphologie aufweisen, in ihrer physiologischen Funktion aber geschädigt sind oder z.B. durch Rückzug des Axons die neuromuskuläre Kopplung unterbrochen ist, während die verbleibenden Motoneuronen bei PACAP-defizienten Tieren aber funktionsfähig sind.

Diese Überlegung steht im Einklang mit den Beobachtungen einer Studie (Armstrong et al., 2008), die ebenfalls keinen Einfluss von PACAP auf das generelle Überleben von Motoneuronen nach Axotomie, wohl aber auf die Axonregeneration feststellen konnten. Zudem war PACAP in der *in vitro*-Studie an Motoneuronen nur in Anwesenheit eines Phosphodiesterasehemmers gegen die glutamatinduzierte Erregungstoxizität protektiv, PACAP alleine hatte keinen Effekt (Tomimatsu and Arakawa, 2008). Phosphodiesterasehemmer blocken den ebenfalls durch PAC-1 induzierten Signalweg über Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG), während die als neuroprotektiv beschriebenen Effekte von PACAP in diversen Neuronentypen auf eine Inhibition der Caspase 3 über den cAMP-MAPK-Signalweg vermittelt werden (siehe Shioda, 2006). Es besteht also der Grund zu der Annahme, dass in den Motoneuronen eigentlich der IP₃-DAG-Signalweg mit bisher unbekannten Effekten überwiegen und eine neuroprotektive Wirkung über cAMP erst bei einer Hemmung der Phosphodiesterase zum tragen kommen könnte. Folglich ist es wahrscheinlicher, dass der neuroprotektive Effekt der PACAP-Deletion nicht direkt am Motoneuron, sondern eher über eine Modulation der Gliareaktion erfolgt.

4.2.4 Auswirkungen der PACAP-Deletion auf die Neuroinflammation

In der quantitativen Erfassung der Neuroinflammation zeigten sich auf morphologischer Ebene bezüglich der Astrozytenaktivierung und der Lymphozyteninfiltration keinerlei Unterschiede zwischen PACAP-kompetenten und PACAP-defizienten SOD1-transgenen Tieren. Allerdings war die Anzahl der Mikroglia in PACAP-defizienten Tieren erhöht, außerdem zeigten die Zellen eine eher amöboide Form, während die Mikroglia in PACAP-kompetenten Tieren eine hypertrophe, größtenteils sogar stark degenerierte Morphologie aufwies. Aus diesem Grund ist die erhöhte Anzahl an Mikroglia allerdings in Frage zu stellen, da die Immunreaktivität der degenerierten Mikroglia in PACAP-kompetenten Tieren nur marginal über dem Gewebshintergrund lag und damit nicht mehr den zur Auswertung eingesetzten Schwellenwert erreichte. Ob sich PACAP-kompetente und -defiziente Tiere tatsächlich in der Anzahl aktivierter Mikroglia unterscheiden, ist also fraglich, doch deutet die unterschiedliche Morphologie der Zellkörper auf eine funktionell andere oder später einsetzende Aktivierung

der Mikroglia in PACAP-defizienten Tieren hin. So spricht die eher amöbiode Form für eine M2-Aktivierung, die im Zeitverlauf der ALS in PACAP-kompetenten Tieren dem Umschlag in einen M1-Phänotyp vorangeht, der bei chronischer Inflammation in Hypertrophie und letztendlich der Degeneration der Mikroglia endet (vergleiche 1.1.4 und Streit, 2002a, Graeber and Streit, 2010).

Diese Beobachtung steht im Widerspruch zu vorangegangenen Studien, die PACAP auf verschiedenen Ebenen, z.B. der Hemmung der Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-6 und TNF α oder der Antigenpräsentation, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine anti-inflammatorische Wirkung zuweisen konnten (Ganea et al., 2003, Kato et al., 2004, Lee and Suk, 2004). Entsprechend sollte nach einer neuronalen Schädigung die Inflammation bei PACAP-defizienten Tieren stärker ausfallen, d.h. z.B. höhere Level an Zytokinen wie TNF α und IL-6 oder eine größere Anzahl aktivierter Gliazellen aufweisen, was im Fall der Axotomie und einem Mausmodell der Multiplen Sklerose bestätigt werden konnte (Armstrong et al., 2008, Tan et al., 2009).

Ebenso wie die Tatsache, dass Motoneuronen im Gegensatz zu einer Axotomie nicht mit einer generellen Induktion der PACAP-Expression reagieren, könnten auch Mikroglia innerhalb der ALS-Pathogenese, insbesondere unter dem Einfluss der SOD1-Mutation, eine andere Reaktion zeigen als bei Axotomie. So ist bereits bekannt, dass Mikroglia mit mutierter SOD1 nach LPS-Stimulation eine im Vergleich zu Mikroglia ohne SOD1-Mutation erhöhte Expression von TNF α , aber eine verringerte Expression von IL-6 aufweisen (Weydt et al., 2004).

Einerseits ist also nicht ausgeschlossen, dass Mikroglia unter einer SOD1-Mutation auch auf eine PACAP-Stimulation bzw. deren Ausbleiben anders reagiert als in Modellen ohne Mutation, andererseits sind in Abhängigkeit der jeweiligen Modelle entgegengesetzte Reaktionen beobachtet worden. Während PACAP einerseits die Expression von IL-6 in Astrozyten und Mikroglia stimulieren kann (Gottschall et al., 1994, Nakatani et al., 2006), führt es vor allem in LPS-stimulierten Mikroglia und Makrophagen zur Inhibition der IL-6-Ausschüttung (Martinez et al., 1998, Delgado et al., 1999, Delgado et al., 2003). IL-6 kann seinerseits wiederum pro- als auch anti-inflammatorische Effekte haben (Yasukawa et al., 2003, Petersen and Pedersen, 2006, Ropelle et al., 2010), spielt eine entscheidende Rolle in der Interaktion zwischen Mikroglia und Lymphozyten (Jones, 2005, Kimura and Kishimoto, 2010), und könnte sogar als neurotropher Faktor fungieren (Wagner, 1996).

4.2.5 Die Rolle von endogenem PACAP in der ALS-Pathologie

Aufgrund der offenen Fragen bezüglich der selektiven PACAP-Induktion in nur wenigen Einzelneuronen und eventueller Effekte der PACAP-Deletion auf die Motoneuronen sowie bezüglich der veränderten Mikrogliareaktion ist es nach dem aktuellen Stand der Ergebnisse unmöglich zu beurteilen, welche Rolle genau endogenes PACAP im Krankheitsverlauf der ALS spielt. Weiterführende Untersuchungen, vor allem die isolierte Betrachtung der beteiligten Zelltypen mit und ohne SOD1-Mutation *in vitro* und eine Analyse der Zytokinexpression in PACAP-defizienten im Vergleich zu PACAP-kompetenten SOD1-transgenen Tieren sind nötig, um die Rolle von PACAP in der ALS-Pathogenese genauer zu definieren. Da die beschriebenen Effekte in PACAP-defizienten Tieren vor allem in der Symptomatik nur geringfügig waren und zudem eine Eingrenzung der potenziell in Frage kommenden, den PACAP-Effekt übermittelnden Signalwege wünschenswert wäre, empfiehlt sich außerdem eine Bestätigung der hier gemachten Beobachtungen durch eine Einkreuzung z.B. einer PAC-1-Deletion in das SOD1-Mausmodell.

4.2.6 Therapeutisches Potential von PACAP-Agonisten und –Antagonisten in der ALS

Sollte sich mit weiterführenden Untersuchungen herausstellen, dass PACAP tatsächlich wie durch die vorliegenden Ergebnisse impliziert eine negative Rolle im Krankheitsverlauf der ALS spielt, käme der Einsatz von Antagonisten als eine möglicher Therapieansatz in Frage. Da sowohl die Induktion von PACAP im Endstadium SOD1-transgener Mäuse als auch die in PACAP-defizienten Tieren beobachteten Unterschiede im Krankheitsverlauf minimal waren, besteht außerdem die Möglichkeit, dass ein durch exogen zugeführtes PACAP vermittelter neuroprotektiver Effekt den des endogenen PACAP übersteigen und sich positiv auf den Krankheitsverlauf auswirken könnte. Sollte sich dies im SOD1-Mausmodell bestätigen, könnte auch der Einsatz eines Agonisten eine Therapiemöglichkeit sein.

Die Tatsache, dass sowohl PACAP₁₋₃₈ (Agonist) als auch PACAP₈₋₃₈ (Antagonist) zu den wenigen Peptiden gehören, die über einen aktiven Transportmechanismus über die Blut-Hirnschranke auch bei intravenöser Gabe ZNS-gängig sind, ist äußerst vorteilhaft für einen eventuellen medikamentösen Einsatz. Von Nachteil ist hingegen die geringe Halbwertszeit der Peptide im Blut, die im Menschen nur 5-10 Minuten beträgt (Li et al., 2007) und die Wirkungsdauer entsprechend einschränkt. Eine Entwicklung von stabileren, aber trotzdem noch hirnschrankengängigen Substanzen wäre also eine wichtige Voraussetzung für eine effektive Therapie.

4.3 Mögliche Beteiligung anderer Neuropeptide

Zwar wurde bezüglich der Vakuolisierung keine Immunoreaktivität anderer Neuropeptide festgestellt, doch exprimierten Astrozyten sowohl die Adrenomedullin-spezifische Rezeptorkomponente RAMP2 also auch VPAC2, der nicht nur für PACAP, sondern auch dem *Vasoaktive intestinale Peptid* (VIP) als Rezeptor dient. So konnte eine erst kürzlich veröffentlichte Studie zeigen, dass die Stimulation von VPAC2 die Caspase 3-vermittelte Inaktivierung des Glutamatrezeptors EAAT2 in Astrozyten inhibiert und die Glutamatwiederaufnahmekapazität der Glia steigert (Goursaud et al., 2011). Der Einsatz eines VPAC2-spezifischen Agonisten könnte also dazu beitragen, den destruktiven Effekt der glutamatergen Erregungstoxizität auf die Motoneuronen zu reduzieren.

Adrenomedullin (AM) wird sowohl von Astrozyten exprimiert als auch von Neuronen als Reaktion auf eine inflammatorische Umgebung hochreguliert (Yeung et al., 1996, Takahashi et al., 2000, Chaung et al., 2011). Außerdem inhibiert AM in Antigen-aktivierten Mikroglia die Ausschüttung von Stickstoffmonoxid und verschiedener Zytokine (Consonni et al., 2011) und es existieren Bindestellen am Muskel (Coppock et al., 1996). Bei peripherer Gabe zusammen mit dem AM-Bindeprotein 1 (AMBP1), das der Faszilitation der Blut-Hirnschranken-Passage dient, kommt es *in vivo* zu einer Reduktion des zentralen Infarkt Volumens nach Ischämie, was sich auf eine Inhibition von neuronaler Apoptose und der Lymphozyteninfiltration zurückführen lässt (Bi et al., 2006, Chaung et al., 2011). Entsprechend ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass auch AM am Krankheitsverlauf der ALS beteiligt ist.

4.4 Fazit

Die Tatsache, dass die RAMP1-Deletion im SOD1-Mausmodell nur einen Effekt auf die Kraftausdauer, nicht aber auf die Maximalkraft ausübte und bei der PACAP-Deletion ausschließlich im Lecktest Unterschiede auftraten, beweist, dass die Etablierung der beiden zusätzlichen Testverfahren gewinnbringend war. Die Beobachtung, dass weder CGRP noch PACAP im Mausmodell eine eindeutige Induktion bzw. Regulation erfahren, zeigt, dass sich Motoneurone im Fall einer zentralen, chronischen Schädigung wie der ALS deutlich anders verhalten als bei einer peripheren, akuten Verletzung wie der Axotomie.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bilden eine wichtige Grundlage für neue, richtungsweisende Forschungsansätze in der ALS. So wurde erstens ein weiterer Beweis dafür geliefert, dass die ALS in Zukunft nicht mehr als reine Motoneuronen- sondern eine Multisystemerkrankung mit verschiedenen Subtypen zu betrachten ist. Zweitens wurde mit CGRP der er-

ste Biomarker für vulnerable Motoneurone identifiziert, der bei zukünftigen Untersuchungen wie Genexpressionanalysen oder elektrophysiologischen Messungen eine Unterscheidung von vulnerablen und resistenten Motoneuronen auf Einzelzelebene erlaubt. Dies ist eine unerlässliche Voraussetzung, um molekulare, physiologische oder anatomische Risikofaktoren zu ermitteln, die die bekannten Unterschiede in der Vulnerabilität verschiedener (Mo-)neuronen erklären. Drittens wurde erstmals gezeigt, dass mit CGRP und PACAP auch Neuropeptide am Krankheitsverlauf der ALS, insbesondere der Ausprägung der Neuroinflammation, beteiligt sind und sich der Einsatz entsprechender Agonisten bzw. Antagonisten für eine die Progression der ALS-Pathogenese verlangsamende Therapie eignen könnten.

5 Anhang

5.1 Literaturverzeichnis

- (1898) A Monument to Charcot. *Br Med J* 2:1778-1779.
- Abad C, Martinez C, Leceta J, Juarranz MG, Delgado M, Gomariz RP (2002) Pituitary Adenylate-Cyclase-Activating Polypeptide Expression in the Immune System. *Neuroimmunomodulation* 10:177-186.
- Abe K, Pan LH, Watanabe M, Konno H, Kato T, Itoyama Y (1997) Upregulation of protein-tyrosine nitration in the anterior horn cells of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Res* 19:124-128.
- Adams BA, Gray SL, Isaac ER, Bianco AC, Vidal-Puig AJ, Sherwood NM (2008) Feeding and Metabolism in Mice Lacking Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide. *Endocrinology* 149:1571-1580.
- Afifi AK, Aleu FP, Goodgold J, MacKay B (1966) Ultrastructure of atrophic muscle in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 16:475-481.
- Alexianu ME, Ho BK, Mohamed AH, La Bella V, Smith RG, Appel SH (1994) The role of calcium-binding proteins in selective motoneuron vulnerability in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 36:846-858.
- Alexianu ME, Kozovska M, Appel SH (2001) Immune reactivity in a mouse model of familial ALS correlates with disease progression. *Neurology* 57:1282-1289.
- Allaman I, Bélanger M, Magistretti PJ (2011) Astrocyte-neuron metabolic relationships: for better and for worse. *Trends in Neurosciences* 34:76-87.
- Allan SM, Rothwell NJ (2003) Inflammation in central nervous system injury. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358:1669-1677.
- Altmayr F, Jusek G, Holzmann B (2010) The neuropeptide calcitonin gene-related peptide causes repression of tumor necrosis factor- α transcription and suppression of ATF-2 promoter recruitment in Toll-like receptor-stimulated dendritic cells. *J Biol Chem* 285:3525-3531.
- Amara SG, Arriza JL, Leff SE, Swanson LW, Evans RM, Rosenfeld MG (1985) Expression in brain of a messenger RNA encoding a novel neuropeptide homologous to calcitonin gene-related peptide. *Science* 229:1094-1097.
- Angerer LM, Cox KH, Angerer RC (1987) Demonstration of tissue-specific gene expression by in situ hybridization. *Methods Enzymol* 152:649-661.
- Antunez C, Torres MJ, Lopez S, Rodriguez-Pena R, Blanca M, Mayorga C, Santamaria-Babi LF (2009) Calcitonin gene-related peptide modulates interleukin-13 in circulating cutaneous lymphocyte-associated antigen-positive T cells in patients with atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 161:547-553.
- Appel SH, Beers DR, Henkel JS (2010) T cell-microglial dialogue in Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis: are we listening? *Trends Immunol* 31:7-17.
- Arimura A, Somogyvari-Vigh A, Miyata A, Mizuno K, Coy DH, Kitada C (1991) Tissue distribution of PACAP as determined by RIA: highly abundant in the rat brain and testes. *Endocrinology* 129:2787-2789.
- Armstrong BD, Abad C, Chhith S, Cheung-Lau G, Hajji OE, Nobuta H, Waschek JA (2008) Impaired nerve regeneration and enhanced neuroinflammatory response in mice lacking pituitary adenylate cyclase activating peptide. *Neuroscience* 151:63-73.
- Armstrong BD, Hu Z, Abad C, Yamamoto M, Rodriguez WI, Cheng J, Tam J, Gomariz RP, Patterson PH, Waschek JA (2003) Lymphocyte regulation of neuropeptide gene expression after neuronal injury. *J Neurosci Res* 74:240-247.
- Avery SV (2011) Molecular targets of oxidative stress. *Biochem J* 434:201-210.
- Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones E (2011) Alzheimer's disease. *Lancet* 377:1019-1031.
- Banks WA, Uchida D, Arimura A, Somogyvari-Vigh A, Shioda S (1996) Transport of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide across the blood-brain barrier and the prevention of ischemia-induced death of hippocampal neurons. *Ann N Y Acad Sci* 805:270-277; discussion 277-279.
- Beers DR, Henkel JS, Zhao W, Wang J, Appel SH (2008) CD4⁺ T cells support glial neuroprotection, slow disease progression, and modify glial morphology in an animal model of inherited ALS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:15558-15563.
- Behzadi G, Ganji F (2005) Morphological alteration in oro-facial CGRP containing motoneurons due to congenital thyroid hypofunction. *Peptides* 26:1486-1491.
- Bendotti C, Calvaresi N, Chiveri L, Prella A, Moggio M, Braga M, Silani V, De Biasi S (2001) Early vacuolization and mitochondrial damage in motor neurons of FALS mice are not associated with apoptosis or with changes in cytochrome oxidase histochemical reactivity. *J Neurol Sci* 191:25-33.
- Benemei S, Nicoletti P, Capone JG, Geppetti P (2009) CGRP receptors in the control of pain and inflammation. *Curr Opin Pharmacol* 9:9-14.
- Bento-Abreu A, Van Damme P, Van Den Bosch L, Robberecht W (2010) The neurobiology of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurosci* 31:2247-2265.
- Bergeron C, Petrunka C, Weyer L (1996) Copper/zinc superoxide dismutase expression in the human central nervous system. Correlation with selective neuronal vulnerability. *Am J Pathol* 148:273-279.
- Bi GR, Zhang HM, Bai LJ, Zhou HJ, Hai H, Zhang H, Fang XB (2006) Effect of adrenomedullin

- on neuron apoptosis, infarction volume and expression of Egr-1 mRNA after focal ischemia-reperfusion in rats. *Neurosci Bull* 22:323-330.
- Boillee S, Vandevelde C, Cleveland D (2006) ALS: A Disease of Motor Neurons and Their Nonneuronal Neighbors. *Neuron* 52:39-59.
- Booj S, Goldstein M, Fischer-Colbrie R, Dahlstrom A (1989) Calcitonin gene-related peptide and chromogranin A: presence and intra-axonal transport in lumbar motor neurons in the rat, a comparison with synaptic vesicle antigens in immunohistochemical studies. *Neuroscience* 30:479-501.
- Borasio GD, Linke R, Schwarz J, Schlamp V, Abel A, Mozley PD, Tatsch K (1998) Dopaminergic deficit in amyotrophic lateral sclerosis assessed with [123 I] IPT single photon emission computed tomography. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 65:263-265.
- Botia B, Basille M, Allais A, Raoult E, Falluel-Morel A, Galas L, Jolivel V, Wurtz O, Komuro H, Fournier A, Vaudry H, Burel D, Gonzalez BJ, Vaudry D (2007) Neurotrophic effects of PACAP in the cerebellar cortex. *Peptides* 28:1746-1752.
- Bourgault S, Vaudry D, Botia B, Couvineau A, Laburthe M, Vaudry H, Fournier A (2008) Novel stable PACAP analogs with potent activity towards the PAC1 receptor. *Peptides* 29:919-932.
- Brain SD, Grant AD (2004) Vascular actions of calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin. *Physiol Rev* 84:903-934.
- Brenneman DE (2007) Neuroprotection: A comparative view of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Peptides* 28:1720-1726.
- Brujin LI, Becher MW, Lee MK, Anderson KL, Jenkins NA, Copeland NG, Sisodia SS, Rothstein JD, Borchelt DR, Price DL, Cleveland DW (1997) ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron* 18:327-338.
- Brujin LI, Houseweart MK, Kato S, Anderson KL, Anderson SD, Ohama E, Reaume AG, Scott RW, Cleveland DW (1998) Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science* 281:1851-1854.
- Cai Y, Xin X, Shim GJ, Mokuno Y, Uehara H, Yamada T, Agui T, Matsumoto K (1997) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and vasoactive intestinal peptide (VIP) stimulate interleukin-6 production through the third subtype of PACAP/VIP receptor in rat bone marrow-derived stromal cells. *Endocrinology* 138:2515-2520.
- Cardoso JCR, Vieira FA, Gomes AS, Power DM (2007) PACAP, VIP and their receptors in the metazoa: Insights about the origin and evolution of the ligand-receptor pair. *Peptides* 28:1902-1919.
- Carriedo SG, Yin HZ, Weiss JH (1996) Motor neurons are selectively vulnerable to AMPA/kainate receptor-mediated injury in vitro. *J Neurosci* 16:4069-4079.
- Cebolla B, Fernandez-Perez A, Perea G, Araque A, Vallejo M (2008) DREAM mediates cAMP-dependent, Ca $^{2+}$ -induced stimulation of GFAP gene expression and regulates cortical astroglialogenesis. *J Neurosci* 28:6703-6713.
- Chaung WW, Wu R, Ji Y, Wang Z, Dong W, Cheyuo C, Qi L, Qiang X, Wang H, Wang P (2011) Peripheral administration of human adrenomedullin and its binding protein attenuates stroke-induced apoptosis and brain injury in rats. *Mol Med*.
- Che MX, Jiang YJ, Xie YY, Jiang LL, Hu HY (2011) Aggregation of the 35-kDa fragment of TDP-43 causes formation of cytoplasmic inclusions and alteration of RNA processing. *FASEB J* 25:2344-2353.
- Chen WH, Tzeng SF (2005) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide prevents cell death in the spinal cord with traumatic injury. *Neurosci Lett* 384:117-121.
- Chen Y, Samal B, Hamelink CR, Xiang CC, Chen M, Vaudry D, Brownstein MJ, Hallenbeck JM, Eiden LE (2006) Neuroprotection by endogenous and exogenous PACAP following stroke. *Regul Pept* 137:4-19.
- Chio A, Traynor BJ, Lombardo F, Fimognari M, Calvo A, Ghiglione P, Mutani R, Restagno G (2008) Prevalence of SOD1 mutations in the Italian ALS population. *Neurology* 70:533-537.
- Choi RC, Ting AK, Lau FT, Xie HQ, Leung KW, Chen VP, Siow NL, Tsim KW (2007) Calcitonin gene-related peptide induces the expression of acetylcholinesterase-associated collagen ColQ in muscle: a distinction in driving two different promoters between fast- and slow-twitch muscle fibers. *J Neurochem* 102:1316-1328.
- Choi RC, Yung LY, Dong TT, Wan DC, Wong YH, Tsim KW (1998) The calcitonin gene-related peptide-induced acetylcholinesterase synthesis in cultured chick myotubes is mediated by cyclic AMP. *J Neurochem* 71:152-160.
- Christopoulos A, Christopoulos G, Morfis M, Udawela M, Laburthe M, Couvineau A, Kuwasako K, Tilakaratne N, Sexton PM (2003) Novel Receptor Partners and Function of Receptor Activity-modifying Proteins. *Journal of Biological Chemistry* 278:3293-3297.
- Clement AM, Nguyen MD, Roberts EA, Garcia ML, Boillee S, Rule M, McMahon AP, Doucette W, Siwek D, Ferrante RJ, Brown RH, Jr., Julien JP, Goldstein LS, Cleveland DW (2003) Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science* 302:113-117.
- Cleveland DW, Liu J (2000) Oxidation versus aggregation - how do SOD1 mutants cause ALS? *Nat Med* 6:1320-1321.
- Cleveland DW, Rothstein JD (2001) From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat Rev Neurosci* 2:806-819.
- Conner AC, Hay DL, Howitt SG, Kilk K, Langel U, Wheatley M, Smith DM, Poyner DR (2002) Interaction of calcitonin-gene-related peptide with its receptors. *Biochem Soc Trans* 30:451-455.
- Consonni A, Morara S, Codazzi F, Grohovaz F, Zacchetti D (2011) Inhibition of lipopolysaccharide-induced microglia activation by calcitonin gene related peptide and adrenomedullin. *Mol Cell Neurosci*.

- Coppock HA, Owji AA, Bloom SR, Smith DM (1996) A rat skeletal muscle cell line (L6) expresses specific adrenomedullin binding sites but activates adenylate cyclase via calcitonin gene-related peptide receptors. *Biochem J* 318 (Pt 1):241-245.
- Coyle JT, Puttfarcken P (1993) Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 262:689-695.
- Cuesta MC, Quintero L, Pons H, Suarez-Roca H (2002) Substance P and calcitonin gene-related peptide increase IL-1 beta, IL-6 and TNF alpha secretion from human peripheral blood mononuclear cells. *Neurochem Int* 40:301-306.
- D'Antoni S, Zambusi L, Codazzi F, Zacchetti D, Grohovaz F, Provini L, Catania MV, Morara S (2010) Calcitonin gene-related peptide (CGRP) stimulates purkinje cell dendrite growth in culture. *Neurochem Res* 35:2135-2143.
- Dachs E, Hereu M, Piedrafita L, Casanovas A, Caldero J, Esquerda JE (2011) Defective neuromuscular junction organization and postnatal myogenesis in mice with severe spinal muscular atrophy. *J Neuropathol Exp Neurol* 70:444-461.
- Dal Canto MC, Gurney ME (1994) Development of central nervous system pathology in a murine transgenic model of human amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Pathol* 145:1271-1279.
- Dal Canto MC, Gurney ME (1997) A low expressor line of transgenic mice carrying a mutant human Cu,Zn superoxide dismutase (SOD1) gene develops pathological changes that most closely resemble those in human amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 93:537-550.
- Delgado M, Jonakait GM, Ganea D (2002) Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit chemokine production in activated microglia. *Glia* 39:148-161.
- Delgado M, Leceta J, Ganea D (2003) Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit the production of inflammatory mediators by activated microglia. *J Leukoc Biol* 73:155-164.
- Delgado M, Martinez C, Pozo D, Calvo JR, Leceta J, Ganea D, Gomariz RP (1999) Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase-activation polypeptide (PACAP) protect mice from lethal endotoxemia through the inhibition of TNF-alpha and IL-6. *J Immunol* 162:1200-1205.
- Dennis T, Fournier A, St Pierre S, Quirion R (1989) Structure-activity profile of calcitonin gene-related peptide in peripheral and brain tissues. Evidence for receptor multiplicity. *J Pharmacol Exp Ther* 251:718-725.
- DeZazzo J, Xia S, Christensen J, Velinzon K, Tully T (1999) Developmental expression of an amn(+) transgene rescues the mutant memory defect of amnesiac adults. *J Neurosci* 19:8740-8746.
- Di Giorgio FP, Carrasco MA, Siao MC, Maniatis T, Eggan K (2007) Non-cell autonomous effect of glia on motor neurons in an embryonic stem cell-based ALS model. *Nat Neurosci* 10:608-614.
- Dickson L (2006) VIP and PACAP Receptor Pharmacology: A Comparison of Intracellular Signaling Pathways. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1070:239-242.
- Dickson L, Finlayson K (2009) VPAC and PAC receptors: From ligands to function. *Pharmacology & Therapeutics* 121:294-316.
- Doods H, Arndt K, Rudolf K, Just S (2007) CGRP antagonists: unravelling the role of CGRP in migraine. *Trends Pharmacol Sci* 28:580-587.
- Drissi H, Lasmoles F, Le Mellay V, Marie PJ, Lieberherr M (1998) Activation of phospholipase C-beta1 via Galphq/11 during calcium mobilization by calcitonin gene-related peptide. *J Biol Chem* 273:20168-20174.
- Ebert S, Schoeberl T, Walczak Y, Stoecker K, Stempfl T, Moehle C, Weber BH, Langmann T (2008) Chondroitin sulfate disaccharide stimulates microglia to adopt a novel regulatory phenotype. *J Leukoc Biol* 84:736-740.
- Edvinsson L (2005) Clinical data on the CGRP antagonist BIBN4096BS for treatment of migraine attacks. *CNS Drug Rev* 11:69-76.
- Edvinsson L (2007) Novel migraine therapy with calcitonin gene-regulated peptide receptor antagonists. *Expert Opin Ther Targets* 11:1179-1188.
- Edvinsson L (2008) CGRP blockers in migraine therapy: where do they act? *Br J Pharmacol* 155:967-969.
- Edvinsson L, Ho TW (2010) CGRP receptor antagonism and migraine. *Neurotherapeutics* 7:164-175.
- Edvinsson L, Linde M (2010) New drugs in migraine treatment and prophylaxis: telcagepant and topiramate. *Lancet* 376:645-655.
- Eisen A (2009) Amyotrophic lateral sclerosis: A 40-year personal perspective. *J Clin Neurosci* 16:505-512.
- Engelhardt JI, Tajti J, Appel SH (1993) Lymphocytic infiltrates in the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 50:30-36.
- Evans BN, Rosenblatt MI, Mnayer LO, Oliver KR, Dickerson IM (2000) CGRP-RCP, a novel protein required for signal transduction at calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin receptors. *J Biol Chem* 275:31438-31443.
- Fahrenkrug J, Hannibal J (2004) Neurotransmitters co-existing with VIP or PACAP. *Peptides* 25:393-401.
- Feany MB, Quinn WG (1995) A neuropeptide gene defined by the Drosophila memory mutant amnesiac. *Science* 268:869-873.
- Field LS, Luk E, Culotta VC (2002) Copper chaperones: personal escorts for metal ions. *J Bioenerg Biomembr* 34:373-379.
- Figiel M, Engele J (2000) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP), a neuron-derived peptide regulating glial glutamate transport and metabolism. *J Neurosci* 20:3596-3605.
- Fornai F, Lenzi P, Gesi M, Ferrucci M, Lazzeri G, Busceti CL, Ruffoli R, Soldani P, Ruggieri S, Alessandri MG, Paparelli A (2003) Fine structure and biochemical mechanisms underlying nigrostriatal inclusions and cell death after proteasome inhibition. *J Neurosci* 23:8955-8966.
- Forsgren S, Bergh A, Carlsson E, Thornell LE (1993) Calcitonin gene-related peptide expression at endplates of different fibre types in

- muscles in rat hind limbs. *Cell Tissue Res* 274:439-446.
- Frey D, Schneider C, Xu L, Borg J, Spooren W, Caroni P (2000) Early and selective loss of neuromuscular synapse subtypes with low sprouting competence in motoneuron diseases. *J Neurosci* 20:2534-2542.
- Fuchs A, Ringer C, Bilkei-Gorzo A, Weihe E, Roeper J, Schutz B (2010) Downregulation of the potassium chloride cotransporter KCC2 in vulnerable motoneurons in the SOD1-G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 69:1057-1070.
- Fukuoka T, Tokunaga A, Kondo E, Miki K, Tachibana T, Noguchi K (1999) Differential regulation of alpha- and beta-CGRP mRNAs within oculomotor, trochlear, abducens, and trigeminal motoneurons in response to axotomy. *Brain Res Mol Brain Res* 63:304-315.
- Ganea D, Rodriguez R, Delgado M (2003) Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: players in innate and adaptive immunity. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 49:127-142.
- Gaytan F, Martinez-Fuentes AJ, Garcia-Navarro F, Vaudry H, Aguilar E (1994) Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) immunolocalization in lymphoid tissues of the rat. *Cell Tissue Res* 276:223-227.
- Geser F, Brandmeir NJ, Kwong LK, Martinez-Lage M, Elman L, McCluskey L, Xie SX, Lee VM, Trojanowski JQ (2008) Evidence of multisystem disorder in whole-brain map of pathological TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 65:636-641.
- Ghatei MA, Takahashi K, Suzuki Y, Gardiner J, Jones PM, Bloom SR (1993) Distribution, molecular characterization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its precursor encoding messenger RNA in human and rat tissues. *J Endocrinol* 136:159-166.
- Gibson SJ, Polak JM, Bloom SR, Sabate IM, Mulderry PM, Ghatei MA, McGregor GP, Morrison JF, Kelly JS, Evans RM, et al. (1984) Calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in the spinal cord of man and of eight other species. *J Neurosci* 4:3101-3111.
- Gibson SJ, Polak JM, Giaid A, Hamid QA, Kar S, Jones PM, Denny P, Legon S, Amara SG, Craig RK, et al. (1988a) Calcitonin gene-related peptide messenger RNA is expressed in sensory neurones of the dorsal root ganglia and also in spinal motoneurons in man and rat. *Neurosci Lett* 91:283-288.
- Gibson SJ, Polak JM, Katagiri T, Su H, Weller RO, Brownell DB, Holland S, Hughes JT, Kikuyama S, Ball J, et al. (1988b) A comparison of the distributions of eight peptides in spinal cord from normal controls and cases of motor neurone disease with special reference to Onuf's nucleus. *Brain Res* 474:255-278.
- Giordana MT, Ferrero P, Grifoni S, Pellerino A, Naldi A, Montuschi A (2011) Dementia and cognitive impairment in amyotrophic lateral sclerosis: a review. *Neurol Sci* 32:9-16.
- Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH (2010) Mechanisms Underlying Inflammation in Neurodegeneration. *Cell* 140:918-934.
- Gomes RN, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT, Soares MB, Shoemaker CB, David JR, Bozza MT (2005) Calcitonin gene-related peptide inhibits local acute inflammation and protects mice against lethal endotoxemia. *Shock* 24:590-594.
- Gottschall PE, Tatsuno I, Arimura A (1994) Regulation of interleukin-6 (IL-6) secretion in primary cultured rat astrocytes: synergism of interleukin-1 (IL-1) and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP). *Brain Res* 637:197-203.
- Goursaud S, Focant MC, Berger JV, Nizet Y, Maloteaux JM, Hermans E (2011) The VPAC2 agonist peptide histidine isoleucine (PHI) up-regulates glutamate transport in the corpus callosum of a rat model of amyotrophic lateral sclerosis (hSOD1G93A) by inhibiting caspase-3 mediated inactivation of GLT-1a. *FASEB J*.
- Gowing G, Dequen F, Soucy G, Julien JP (2006) Absence of tumor necrosis factor-alpha does not affect motor neuron disease caused by superoxide dismutase 1 mutations. *J Neurosci* 26:11397-11402.
- Gowing G, Philips T, Van Wijmeersch B, Audet JN, Dewil M, Van Den Bosch L, Billiau AD, Robberecht W, Julien JP (2008) Ablation of proliferating microglia does not affect motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis caused by mutant superoxide dismutase. *J Neurosci* 28:10234-10244.
- Graeber MB, Streit WJ (2010) Microglia: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119:89-105.
- Gray SL (2002) Temperature-Sensitive Phenotype in Mice Lacking Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide. *Endocrinology* 143:3946-3954.
- Grimaldi M, Cavallaro S (1999) Functional and molecular diversity of PACAP/VIP receptors in cortical neurons and type I astrocytes. *Eur J Neurosci* 11:2767-2772.
- Guegan C, Vila M, Rosoklija G, Hays AP, Przedborski S (2001) Recruitment of the mitochondrial-dependent apoptotic pathway in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* 21:6569-6576.
- Gulbenkian S, Merighi A, Wharton J, Varndell IM, Polak JM (1986) Ultrastructural evidence for the coexistence of calcitonin gene-related peptide and substance P in secretory vesicles of peripheral nerves in the guinea pig. *J Neurocytol* 15:535-542.
- Guo YS, Wu DX, Wu HR, Wu SY, Yang C, Li B, Bu H, Zhang YS, Li CY (2009) Sensory involvement in the SOD1-G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Mol Med* 41:140-150.
- Gurney ME (1994) Transgenic-mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 331:1721-1722.
- Haas CA, Reddington M, Kreutzberg GW (1991) Calcitonin Gene-related Peptide Stimulates the Induction of c-fos Gene Expression in Rat Astrocyte Cultures. *Eur J Neurosci* 3:708-712.
- Haenggeli C, Kato AC (2002) Differential vulnerability of cranial motoneurons in mouse models with motor neuron degeneration. *Neurosci Lett* 335:39-43.

- Halliwell B, Gutteridge JM (1984) Free radicals, lipid peroxidation, and cell damage. *Lancet* 2:1095.
- Hamelink C, Tjurmina O, Damadzic R, Young WS, Weihe E, Lee HW, Eiden LE (2002) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is a sympathoadrenal neurotransmitter involved in catecholamine regulation and glucohomeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:461-466.
- Han TH, Blanchard RL, Palcza J, Martucci A, Miller-Stein CM, Gutierrez M, Panebianco D, Rippley RK, Lines C, Murphy MG (2010) The Dose Proportionality of Telcagepant after Administration of Single Oral and Intravenous Doses in Healthy Adult Subjects. *Arch Drug Inf* 3:55-62.
- Hannibal J (2002) Pituitary adenylate cyclase-activating peptide in the rat central nervous system: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *J Comp Neurol* 453:389-417.
- Harraz MM, Marden JJ, Zhou W, Zhang Y, Williams A, Sharov VS, Nelson K, Luo M, Paulson H, Schoneich C, Engelhardt JF (2008) SOD1 mutations disrupt redox-sensitive Rac regulation of NADPH oxidase in a familial ALS model. *J Clin Invest* 118:659-670.
- Harwood CA, McDermott CJ, Shaw PJ (2009) Physical activity as an exogenous risk factor in motor neuron disease (MND): a review of the evidence. *Amyotroph Lateral Scler* 10:191-204.
- Harzenetter MD, Novotny AR, Gais P, Molina CA, Altmayr F, Holzmann B (2007) Negative regulation of TLR responses by the neuropeptide CGRP is mediated by the transcriptional repressor ICER. *J Immunol* 179:607-615.
- Hashimoto H (2001) Altered psychomotor behaviors in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98:13355-13360.
- Hashimoto H (2006) New Insights into the Central PACAPergic System from the Phenotypes in PACAP- and PACAP Receptor-Knockout Mice. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1070:75-89.
- Hashimoto H, Ishihara T, Shigemoto R, Mori K, Nagata S (1993) Molecular cloning and tissue distribution of a receptor for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Neuron* 11:333-342.
- Hashimoto H, Kunugi A, Arakawa N, Shintani N, Fujita T, Kasai A, Kawaguchi C, Morita Y, Hirose M, Sakai Y, Baba A (2003) Possible involvement of a cyclic AMP-dependent mechanism in PACAP-induced proliferation and ERK activation in astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 311:337-343.
- Hashimoto H, Shintani N, Baba A (2002) Higher brain functions of PACAP and a homologous *Drosophila* memory gene *amnesiac*: insights from knockouts and mutants. *Biochem Biophys Res Commun* 297:427-431.
- Hashimoto H, Yamamoto K, Hagigara N, Ogawa N, Nishino A, Aino H, Nogi H, Imanishi K, Matsuda T, Baba A (1996) cDNA cloning of a mouse pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor. *Biochim Biophys Acta* 1281:129-133.
- Hay DL (2007) What makes a CGRP2 receptor? *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34:963-971.
- Hay DL, Christopoulos G, Christopoulos A, Poyner DR, Sexton PM (2005) Pharmacological discrimination of calcitonin receptor: receptor activity-modifying protein complexes. *Mol Pharmacol* 67:1655-1665.
- Hay DL, Poyner DR, Sexton PM (2006) GPCR modulation by RAMPs. *Pharmacol Ther* 109:173-197.
- Hayar A, Bryant JL, Boughter JD, Heck DH (2006) A low-cost solution to measure mouse licking in an electrophysiological setup with a standard analog-to-digital converter. *J Neurosci Methods* 153:203-207.
- Hayashi H, Kato S, Kawada A (1991) Amyotrophic lateral sclerosis patients living beyond respiratory failure. *J Neurol Sci* 105:73-78.
- Hedlund E, Karlsson M, Osborn T, Ludwig W, Isacson O (2010) Global gene expression profiling of somatic motor neuron populations with different vulnerability identify molecules and pathways of degeneration and protection. *Brain* 133:2313-2330.
- Hegedus J, Putman CT, Gordon T (2007) Time course of preferential motor unit loss in the SOD1 G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 28:154-164.
- Henkel JS, Beers DR, Zhao W, Appel SH (2009) Microglia in ALS: the good, the bad, and the resting. *J Neuroimmune Pharmacol* 4:389-398.
- Henkel JS, Engelhardt JL, Siklos L, Simpson EP, Kim SH, Pan T, Goodman JC, Siddique T, Beers DR, Appel SH (2004) Presence of dendritic cells, MCP-1, and activated microglia/macrophages in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord tissue. *Ann Neurol* 55:221-235.
- Higgins CM, Jung C, Xu Z (2003) ALS-associated mutant SOD1G93A causes mitochondrial vacuolation by expansion of the intermembrane space and by involvement of SOD1 aggregation and peroxisomes. *BMC Neurosci* 4:16.
- Hirano A, Donnenfeld H, Sasaki S, Nakano I (1984) Fine structural observations of neurofilamentous changes in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 43:461-470.
- Ho TW, Edvinsson L, Goadsby PJ (2010) CGRP and its receptors provide new insights into migraine pathophysiology. *Nat Rev Neurol* 6:573-582.
- Ho TW, Ferrari MD, Dodick DW, Galet V, Kost J, Fan X, Leibensperger H, Froman S, Assaid C, Lines C, Koppen H, Winner PK (2008) Efficacy and tolerability of MK-0974 (telcagepant), a new oral antagonist of calcitonin gene-related peptide receptor, compared with zolmitriptan for acute migraine: a randomised, placebo-controlled, parallel-treatment trial. *Lancet* 372:2115-2123.
- Hosoya M, Kimura C, Ogi K, Ohkubo S, Miyamoto Y, Kugoh H, Shimizu M, Onda H, Oshimura M, Arimura A, et al. (1992) Structure of the human pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) gene. *Biochim Biophys Acta* 1129:199-206.
- Inagaki N, Yoshida H, Mizuta M, Mizuno N, Fujii Y, Gonoi T, Miyazaki J, Seino S (1994) Cloning and functional characterization of a third pituitary adenylate cyclase-activating

- polypeptide receptor subtype expressed in insulin-secreting cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:2679-2683.
- Isaacs JD, Dean AF, Shaw CE, Al-Chalabi A, Mills KR, Leigh PN (2007) Amyotrophic lateral sclerosis with sensory neuropathy: part of a multisystem disorder? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 78:750-753.
- Ishihara T, Nakamura S, Kaziyo Y, Takahashi T, Takahashi K, Nagata S (1991) Molecular cloning and expression of a cDNA encoding the secretin receptor. *EMBO J* 10:1635-1641.
- Ittner LM, Gotz J (2011) Amyloid-beta and tau--a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 12:65-72.
- Jaarsma D (2006) Swelling and vacuolisation of mitochondria in transgenic SOD1-ALS mice: a consequence of supranormal SOD1 expression? *Mitochondrion* 6:48-49; author reply 50-41.
- Jaarsma D, Haasdijk ED, Grashorn JA, Hawkins R, van Duijn W, Verspaget HW, London J, Holstege JC (2000) Human Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) overexpression in mice causes mitochondrial vacuolization, axonal degeneration, and premature motoneuron death and accelerates motoneuron disease in mice expressing a familial amyotrophic lateral sclerosis mutant SOD1. *Neurobiol Dis* 7:623-643.
- Jaarsma D, Rognoni F, van Duijn W, Verspaget HW, Haasdijk ED, Holstege JC (2001) CuZn superoxide dismutase (SOD1) accumulates in vacuolated mitochondria in transgenic mice expressing amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutations. *Acta Neuropathol* 102:293-305.
- Jamen F, Rodriguez-Henche N, Pralong F, Jegou B, Gaillard R, Bockaert J, Brabet P (2000) PAC1 null females display decreased fertility. *Ann N Y Acad Sci* 921:400-404.
- Jaworski DM (2000) Expression of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and the PACAP-selective receptor in cultured rat astrocytes, human brain tumors, and in response to acute intracranial injury. *Cell Tissue Res* 300:219-230.
- Jaworski DM, Proctor MD (2000) Developmental regulation of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and PAC(1) receptor mRNA expression in the rat central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res* 120:27-39.
- Johnson MC, McCormack RJ, Delgado M, Martinez C, Ganea D (1996) Murine T-lymphocytes express vasoactive intestinal peptide receptor 1 (VIP-R1) mRNA. *J Neuroimmunol* 68:109-119.
- Jones SA (2005) Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J Immunol* 175:3463-3468.
- Jonsson PA, Graffmo KS, Brannstrom T, Nilsson P, Andersen PM, Marklund SL (2006) Motor neuron disease in mice expressing the wild type-like D90A mutant superoxide dismutase-1. *J Neuropathol Exp Neurol* 65:1126-1136.
- Joo KM, Chung YH, Kim MK, Nam RH, Lee BL, Lee KH, Cha CI (2004) Distribution of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors (VPAC1, VPAC2, and PAC1 receptor) in the rat brain. *The Journal of Comparative Neurology* 476:388-413.
- Julien JP, Kriz J (2006) Transgenic mouse models of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta* 1762:1013-1024.
- Jung C, Higgins CM, Xu Z (2002) Mitochondrial electron transport chain complex dysfunction in a transgenic mouse model for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 83:535-545.
- Kang J, Rivest S (2007) MyD88-deficient bone marrow cells accelerate onset and reduce survival in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Cell Biol* 179:1219-1230.
- Kapas S, Clark AJ (1995) Identification of an orphan receptor gene as a type 1 calcitonin gene-related peptide receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 217:832-838.
- Kassa RM, Mariotti R, Bonaconsa M, Bertini G, Bentivoglio M (2009) Gene, cell, and axon changes in the familial amyotrophic lateral sclerosis mouse sensorimotor cortex. *J Neuropathol Exp Neurol* 68:59-72.
- Katafuchi T, Minamino N (2004) Structure and biological properties of three calcitonin receptor-stimulating peptides, novel members of the calcitonin gene-related peptide family. *Peptides* 25:2039-2045.
- Katafuchi T, Yasue H, Osaki T, Minamino N (2009) Calcitonin receptor-stimulating peptide: Its evolutionary and functional relationship with calcitonin/calcitonin gene-related peptide based on gene structure☆. *Peptides* 30:1753-1762.
- Kato H, Ito A, Kawanokuchi J, Jin S, Mizuno T, Ojika K, Ueda R, Suzumura A (2004) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by suppressing the functions of antigen presenting cells. *Mult Scler* 10:651-659.
- Kato S, Oda M, Hayashi H, Shimizu T, Hayashi M, Kawata A, Tanabe H (1995) Decrease of medullary catecholaminergic neurons in multiple system atrophy and Parkinson's disease and their preservation in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 132:216-221.
- Kato T, Hirano A, Manaka H, Sasaki H, Katagiri T, Kawanami T, Shikama Y, Seino T (1991) Calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* 133:163-167.
- Kawamata H, Manfredi G (2010) Mitochondrial dysfunction and intracellular calcium dysregulation in ALS. *Mech Ageing Dev* 131:517-526.
- Kerschensteiner M, Mehl E, Hohlfeld R (2009) Neuro-immune crosstalk in CNS diseases. *Neuroscience* 158:1122-1132.
- Kiernan MC, Vucic S, Cheah BC, Turner MR, Eisen A, Hardiman O, Burrell JR, Ziegler MC (2011) Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* 377:942-955.
- Kim WK, Kan Y, Ganea D, Hart RP, Gozes I, Jonakait GM (2000) Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit tumor necrosis factor-alpha production in injured spinal cord and in activated microglia via a cAMP-dependent pathway. *J Neurosci* 20:3622-3630.

- Kimura A, Kishimoto T (2010) IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *Eur J Immunol* 40:1830-1835.
- Kong J, Xu Z (1998) Massive mitochondrial degeneration in motor neurons triggers the onset of amyotrophic lateral sclerosis in mice expressing a mutant SOD1. *J Neurosci* 18:3241-3250.
- Kreutzberg GW (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19:312-318.
- Kuramoto H, Kondo H, Fujita T (1987) Calcitonin gene-related peptide (CGRP)-like immunoreactivity in scattered chromaffin cells and nerve fibers in the adrenal gland of rats. *Cell Tissue Res* 247:309-315.
- Kushner PD, Stephenson DT, Wright S (1991) Reactive astrogliosis is widespread in the subcortical white matter of amyotrophic lateral sclerosis brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 50:263-277.
- Laburthe M, Couvineau A (2002) Molecular pharmacology and structure of VPAC Receptors for VIP and PACAP. *Regul Pept* 108:165-173.
- Laburthe M, Couvineau A, Marie JC (2002) VPAC receptors for VIP and PACAP. *Receptors Channels* 8:137-153.
- Laburthe M, Couvineau A, Tan V (2007) Class II G protein-coupled receptors for VIP and PACAP: Structure, models of activation and pharmacology. *Peptides* 28:1631-1639.
- Lacomblez L, Bensimon G, Leigh PN, Guillet P, Meininger V (1996) Dose-ranging study of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. Amyotrophic Lateral Sclerosis/Riluzole Study Group II. *Lancet* 347:1425-1431.
- Laslo P, Lipski J, Nicholson LF, Miles GB, Funk GD (2000) Calcium binding proteins in motoneurons at low and high risk for degeneration in ALS. *NeuroReport* 11:3305-3308.
- Lastres-Becker I, Fernandez-Perez A, Cebolla B, Vallejo M (2008) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates glial fibrillary acidic protein gene expression in cortical precursor cells by activating Ras and Rap1. *Mol Cell Neurosci* 39:291-301.
- Lazar P, Reddington M, Streit W, Raivich G, Kreutzberg GW (1991) The action of calcitonin gene-related peptide on astrocyte morphology and cyclic AMP accumulation in astrocyte cultures from neonatal rat brain. *Neurosci Lett* 130:99-102.
- Le Greves P, Nyberg F, Hokfelt T, Terenius L (1989) Calcitonin gene-related peptide is metabolized by an endopeptidase hydrolyzing substance P. *Regul Pept* 25:277-286.
- Leceta J, Gomariz RP, Martinez C, Abad C, Ganea D, Delgado M (2000) Receptors and transcriptional factors involved in the anti-inflammatory activity of VIP and PACAP. *Ann N Y Acad Sci* 921:92-102.
- Lee H, Suk K (2004) Selective modulation of microglial signal transduction by PACAP. *NeuroReport* 15:1469-1474.
- Lee JK, Tran T, Tansey MG (2009) Neuroinflammation in Parkinson's disease. *J Neuroimmune Pharmacol* 4:419-429.
- Legradi G, Shioda S, Arimura A (1994) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-like immunoreactivity in autonomic regulatory areas of the rat medulla oblongata. *Neurosci Lett* 176:193-196.
- Leichsenring A, Linnartz B, Zhu XR, Lubbert H, Stichel CC (2006) Ascending neuropathology in the CNS of a mutant SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res* 1096:180-195.
- Levine JB, Kong J, Nadler M, Xu Z (1999) Astrocytes interact intimately with degenerating motor neurons in mouse amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Glia* 28:215-224.
- Li M, Maderdrut JL, Lertora JJ, Batuman V (2007) Intravenous infusion of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in a patient with multiple myeloma and myeloma kidney: a case study. *Peptides* 28:1891-1895.
- Liang X, Wang Q, Shi J, Lokteva L, Breyer RM, Montine TJ, Andreasson K (2008) The prostaglandin E2 EP2 receptor accelerates disease progression and inflammation in a model of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 64:304-314.
- Link AS, Kuris A, Edvinsson L (2008) Treatment of migraine attacks based on the interaction with the trigemino-cerebrovascular system. *J Headache Pain* 9:5-12.
- Lips MB, Keller BU (1998) Endogenous calcium buffering in motoneurons of the nucleus hypoglossus from mouse. *J Physiol* 511 (Pt 1):105-117.
- Liu D, Wen J, Liu J, Li L (1999) The roles of free radicals in amyotrophic lateral sclerosis: reactive oxygen species and elevated oxidation of protein, DNA, and membrane phospholipids. *FASEB J* 13:2318-2328.
- Lorenzo LE, Barbe A, Portalier P, Fritschy JM, Bras H (2006) Differential expression of GABAA and glycine receptors in ALS-resistant vs. ALS-vulnerable motoneurons: possible implications for selective vulnerability of motoneurons. *Eur J Neurosci* 23:3161-3170.
- Lu JT, Son YJ, Lee J, Jetton TL, Shiota M, Moscoso L, Niswender KD, Loewy AD, Magnuson MA, Sanes JR, Emeson RB (1999) Mice lacking alpha-calcitonin gene-related peptide exhibit normal cardiovascular regulation and neuromuscular development. *Mol Cell Neurosci* 14:99-120.
- Ma L, Ostrovsky H, Miles G, Lipski J, Funk GD, Nicholson LF (2006) Differential expression of group I metabotropic glutamate receptors in human motoneurons at low and high risk of degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience* 143:95-104.
- Mackenzie IR, Rademakers R, Neumann M (2010) TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Lancet Neurol* 9:995-1007.
- Marchetto MC, Muotri AR, Mu Y, Smith AM, Cezar GG, Gage FH (2008) Non-cell-autonomous effect of human SOD1 G37R astrocytes on motor neurons derived from human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 3:649-657.
- Marden JJ, Harraz MM, Williams AJ, Nelson K, Luo M, Paulson H, Engelhardt JF (2007) Redox modifier genes in amyotrophic lateral sclerosis in mice. *J Clin Invest* 117:2913-2919.
- Martin JL, Gasser D, Magistretti PJ (1995) Vasoactive intestinal peptide and pituitary

- adenylate cyclase-activating polypeptide potentiate c-fos expression induced by glutamate in cultured cortical neurons. *J Neurochem* 65:1-9.
- Martinez C, Delgado M, Pozo D, Leceta J, Calvo JR, Ganea D, Gomariz RP (1998) Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide modulate endotoxin-induced IL-6 production by murine peritoneal macrophages. *J Leukoc Biol* 63:591-601.
- McCulloch DA, Lutz EM, Johnson MS, MacKenzie CJ, Mitchell R (2000) Differential activation of phospholipase D by VPAC and PAC1 receptors. *Ann N Y Acad Sci* 921:175-185.
- McGeer PL, McGeer EG (2002) Innate immunity, local inflammation, and degenerative disease. *Sci Aging Knowledge Environ* 2002:re3.
- McGillis JP, Humphreys S, Reid S (1991) Characterization of functional calcitonin gene-related peptide receptors on rat lymphocytes. *J Immunol* 147:3482-3489.
- McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, Thompson N, Solari R, Lee MG, Foord SM (1998) RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature* 393:333-339.
- Melton DA, Krieg PA, Rebagliati MR, Maniatis T, Zinn K, Green MR (1984) Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucleic Acids Res* 12:7035-7056.
- Miki Y, Mori F, Nunomura J, Ookawa K, Yajima N, Yagihashi S, Wakabayashi K (2010) Sporadic amyotrophic lateral sclerosis with pallido-nigro-lusian degeneration: a TDP-43 immunohistochemical study. *Neuropathology* 30:149-153.
- Mimeault M, Quirion R, Dumont Y, St-Pierre S, Fournier A (1992) Structure-activity study of hCGRP8-37, a calcitonin gene-related peptide receptor antagonist. *J Med Chem* 35:2163-2168.
- Miyata A, Arimura A, Dahl RR, Minamino N, Uehara A, Jiang L, Culler MD, Coy DH (1989) Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun* 164:567-574.
- Miyata A, Jiang L, Dahl RD, Kitada C, Kubo K, Fujino M, Minamino N, Arimura A (1990) Isolation of a neuropeptide corresponding to the N-terminal 27 residues of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide with 38 residues (PACAP38). *Biochem Biophys Res Commun* 170:643-648.
- Miyata A, Sano H, Li M, Matsuda Y, Kaiya H, Sato K, Matsuo H, Kangawa K, Arimura A (2000) Genomic organization and chromosomal localization of the mouse pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) gene. *Ann N Y Acad Sci* 921:344-348.
- Moisse K, Strong MJ (2006) Innate immunity in amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta* 1762:1083-1093.
- Moreno MJ, Terron JA, Stanimirovic DB, Doods H, Hamel E (2002) Characterization of calcitonin gene-related peptide (CGRP) receptors and their receptor-activity-modifying proteins (RAMPs) in human brain microvascular and astroglial cells in culture. *Neuropharmacology* 42:270-280.
- Morfis M, Christopoulos A, Sexton PM (2003) RAMPs: 5 years on, where to now? *Trends Pharmacol Sci* 24:596-601.
- Morio H, Tatsuno I, Hirai A, Tamura Y, Saito Y (1996) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide protects rat-cultured cortical neurons from glutamate-induced cytotoxicity. *Brain Res* 741:82-88.
- Morrow JA, Lutz EM, West KM, Fink G, Harmar AJ (1993) Molecular cloning and expression of a cDNA encoding a receptor for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP). *FEBS Lett* 329:99-105.
- Mulderry PK, Ghatei MA, Spokes RA, Jones PM, Pierson AM, Hamid QA, Kanse S, Amara SG, Burrin JM, Legon S, et al. (1988) Differential expression of alpha-CGRP and beta-CGRP by primary sensory neurons and enteric autonomic neurons of the rat. *Neuroscience* 25:195-205.
- Mulle C, Benoit P, Pinset C, Roa M, Changeux JP (1988) Calcitonin gene-related peptide enhances the rate of desensitization of the nicotinic acetylcholine receptor in cultured mouse muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:5728-5732.
- Nagai M, Re DB, Nagata T, Chalazonitis A, Jessell TM, Wichterle H, Przedborski S (2007) Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. *Nat Neurosci* 10:615-622.
- Nagy D, Kato T, Kushner PD (1994) Reactive astrocytes are widespread in the cortical gray matter of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci Res* 38:336-347.
- Nakamachi T, Li M, Shioda S, Arimura A (2006) Signaling involved in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-stimulated ADNP expression. *Peptides* 27:1859-1864.
- Nakamura T, Lipton SA (2010) Redox regulation of mitochondrial fission, protein misfolding, synaptic damage, and neuronal cell death: potential implications for Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Apoptosis* 15:1354-1363.
- Nakamura H, Fukuda Y, Koida M, Fujii N, Otaka A, Funakoshi S, Yajima H, Mitsuyasu N, Orłowski RC (1986) Binding sites of calcitonin gene-related peptide (CGRP): abundant occurrence in visceral organs. *Jpn J Pharmacol* 42:175-180.
- Nakatani M, Seki T, Shinohara Y, Taki C, Nishimura S, Takaki A, Shioda S (2006) Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) stimulates production of interleukin-6 in rat Muller cells. *Peptides* 27:1871-1876.
- New HV, Mudge AW (1986) Calcitonin gene-related peptide regulates muscle acetylcholine receptor synthesis. *Nature* 323:809-811.
- Neymotin A, Petri S, Calingasan NY, Wille E, Schafer P, Stewart C, Hensley K, Beal MF, Kiaei M (2009) Lenalidomide (Revlimid) administration at symptom onset is neuroprotective in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol* 220:191-197.
- Nguyen MD, Julien JP, Rivest S (2001) Induction of proinflammatory molecules in mice with amyotrophic lateral sclerosis: no requirement for proapoptotic interleukin-1beta in neurodegeneration. *Ann Neurol* 50:630-639.

- Nishihira Y, Tan CF, Onodera O, Toyoshima Y, Yamada M, Morita T, Nishizawa M, Kakita A, Takahashi H (2008) Sporadic amyotrophic lateral sclerosis: two pathological patterns shown by analysis of distribution of TDP-43-immunoreactive neuronal and glial cytoplasmic inclusions. *Acta Neuropathol* 116:169-182.
- Nohr D, Eiden LE, Weihe E (1995) Coexpression of vasoactive intestinal peptide, calcitonin gene-related peptide and substance P immunoreactivity in parasympathetic neurons of the rhesus monkey lung. *Neurosci Lett* 199:25-28.
- Nohr D, Schafer MK, Persson S, Romeo H, Nyberg F, Post C, Ekstrom G, Weihe E (1999) Calcitonin gene-related peptide gene expression in collagen-induced arthritis is differentially regulated in primary afferents and motoneurons: influence of glucocorticoids. *Neuroscience* 93:759-773.
- Nowak JZ, Jozwiak-Bebenista M, Bednarek K (2007) Effects of PACAP and VIP on cyclic AMP formation in rat neuronal and astrocyte cultures under normoxic and hypoxic condition. *Peptides* 28:1706-1712.
- Obal I, Engelhardt JI, Siklos L (2006) Axotomy induces contrasting changes in calcium and calcium-binding proteins in oculomotor and hypoglossal nuclei of Balb/c mice. *J Comp Neurol* 499:17-32.
- Ogi K, Miyamoto Y, Masuda Y, Habata Y, Hosoya M, Ohtaki T, Masuo Y, Onda H, Fujino M (1993) Molecular cloning and functional expression of a cDNA encoding a human pituitary adenylate cyclase activating polypeptide receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 196:1511-1521.
- Ohki M, Kanayama R, Nakamura T, Okuyama T, Kimura Y, Koike Y (1994) Ocular abnormalities in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Otolaryngol Suppl* 511:138-142.
- Ohno F, Watanabe J, Sekihara H, Hirabayashi T, Arata S, Kikuyama S, Shioda S, Nakaya K, Nakajo S (2005) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide promotes differentiation of mouse neural stem cells into astrocytes. *Regul Pept* 126:115-122.
- Oku R, Satoh M, Fujii N, Otaka A, Yajima H, Takagi H (1987) Calcitonin gene-related peptide promotes mechanical nociception by potentiating release of substance P from the spinal dorsal horn in rats. *Brain Res* 403:350-354.
- Onoue S, Endo K, Ohshima K, Yajima T, Kashimoto K (2002a) The neuropeptide PACAP attenuates beta-amyloid (1-42)-induced toxicity in PC12 cells. *Peptides* 23:1471-1478.
- Onoue S, Endo K, Yajima T, Kashimoto K (2002b) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and vasoactive intestinal peptide attenuate glutamate-induced nNOS activation and cytotoxicity. *Regul Pept* 107:43-47.
- Onoue S, Waki Y, Nagano Y, Satoh S, Kashimoto K (2001) The neuromodulatory effects of VIP/PACAP on PC-12 cells are associated with their N-terminal structures. *Peptides* 22:867-872.
- Otto C, Kovalchuk Y, Wolfer DP, Gass P, Martin M, Zuschratter W, Grone HJ, Kellendonk C, Tronche F, Maldonado R, Lipp HP, Konnerth A, Schutz G (2001) Impairment of mossy fiber long-term potentiation and associative learning in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide type I receptor-deficient mice. *J Neurosci* 21:5520-5527.
- Panov AV, Kubalik N, Zinchenko N, Ridings DM, Radoff DA, Hemendinger R, Brooks BR, Bonkovsky HL (2011) Metabolic and functional differences between brain and spinal cord mitochondria underlie different predisposition to pathology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 300:R844-854.
- Pantaloni C, Brabet P, Bilanges B, Dumuis A, Houssami S, Spengler D, Bockaert J, Journot L (1996) Alternative splicing in the N-terminal extracellular domain of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor modulates receptor selectivity and relative potencies of PACAP-27 and PACAP-38 in phospholipase C activation. *J Biol Chem* 271:22146-22151.
- Papadimitriou D, Le Verche V, Jacquier A, Ikiz B, Przedborski S, Re DB (2010) Inflammation in ALS and SMA: Sorting out the good from the evil. *Neurobiology of Disease* 37:493-502.
- Pardo CA, Xu Z, Borchelt DR, Price DL, Sisodia SS, Cleveland DW (1995) Superoxide dismutase is an abundant component in cell bodies, dendrites, and axons of motor neurons and in a subset of other neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:954-958.
- Pasinelli P, Houseweart MK, Brown RH, Jr., Cleveland DW (2000) Caspase-1 and -3 are sequentially activated in motor neuron death in Cu,Zn superoxide dismutase-mediated familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:13901-13906.
- Pehar M, Vargas MR, Cassina P, Barbeito AG, Beckman JS, Barbeito L (2005) Complexity of Astrocyte-Motor Neuron Interactions in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurodegenerative Diseases* 2:139-146.
- Perea G, Navarrete M, Araque A (2009) Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci* 32:421-431.
- Perry JJ, Shin DS, Getzoff ED, Tainer JA (2010) The structural biochemistry of the superoxide dismutases. *Biochim Biophys Acta* 1804:245-262.
- Petersen AM, Pedersen BK (2006) The role of IL-6 in mediating the anti-inflammatory effects of exercise. *J Physiol Pharmacol* 57 Suppl 10:43-51.
- Pettersson LM, Dahlin LB, Danielsen N (2004a) Changes in expression of PACAP in rat sensory neurons in response to sciatic nerve compression. *Eur J Neurosci* 20:1838-1848.
- Pettersson LME, Heine T, Verge VMK, Sundler F, Danielsen N (2004b) PACAP mRNA is expressed in rat spinal cord neurons. *The Journal of Comparative Neurology* 471:85-96.
- Pettersson M, Ahren B, Bottcher G, Sundler F (1986) Calcitonin gene-related peptide: occurrence in pancreatic islets in the mouse and the rat and inhibition of insulin secretion in the mouse. *Endocrinology* 119:865-869.
- Philips T, Robberecht W (2011) Neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: role of glial

- activation in motor neuron disease. *Lancet Neurol* 10:253-263.
- Piehl F, Arvidsson U, Hokfelt T, Cullheim S (1993) Calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity in motoneuron pools innervating different hind limb muscles in the rat. *Exp Brain Res* 96:291-303.
- Piotrkiewicz M, Hausmanowa-Petrusewicz I (2011) Motoneuron afterhyperpolarisation duration in amyotrophic lateral sclerosis. *J Physiol* 589:2745-2754.
- Pondel MD, Jagger C, Hebden C, Partington G, Mould R (2002) Transcriptional regulation of the calcitonin receptor gene. *Biochem Soc Trans* 30:423-427.
- Poon HF, Hensley K, Thongboonkerd V, Merchant ML, Lynn BC, Pierce WM, Klein JB, Calabrese V, Butterfield DA (2005) Redox proteomics analysis of oxidatively modified proteins in G93A-SOD1 transgenic mice—a model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radic Biol Med* 39:453-462.
- Popper P, Micevych PE (1989) Localization of calcitonin gene-related peptide and its receptors in a striated muscle. *Brain Res* 496:180-186.
- Priller J, Haas CA, Reddington M, Kreutzberg GW (1995) Calcitonin gene-related peptide and ATP induce immediate early gene expression in cultured rat microglial cells. *Glia* 15:447-457.
- Przedborski S, Dhawan V, Donaldson DM, Murphy PL, McKenna-Yasek D, Mandel FS, Brown RH, Jr., Eidelberg D (1996) Nigrostriatal dopaminergic function in familial amyotrophic lateral sclerosis patients with and without copper/zinc superoxide dismutase mutations. *Neurology* 47:1546-1551.
- Pun S, Santos AF, Saxena S, Xu L, Caroni P (2006) Selective vulnerability and pruning of phasic motoneuron axons in motoneuron disease alleviated by CNTF. *Nat Neurosci* 9:408-419.
- Qi T, Hay DL (2010) Structure-function relationships of the N-terminus of receptor activity-modifying proteins. *Br J Pharmacol* 159:1059-1068.
- Ramirez OA, Couve A (2011) The endoplasmic reticulum and protein trafficking in dendrites and axons. *Trends Cell Biol* 21:219-227.
- Ramirez OA, Hartel S, Couve A (2011) Location matters: the endoplasmic reticulum and protein trafficking in dendrites. *Biol Res* 44:17-23.
- Ransohoff RM, Perry VH (2009) Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol* 27:119-145.
- Raoul C, Buhler E, Sadeghi C, Jacquier A, Aebischer P, Pettmann B, Henderson CE, Haase G (2006) Chronic activation in presymptomatic amyotrophic lateral sclerosis (ALS) mice of a feedback loop involving Fas, Daxx, and FasL. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:6007-6012.
- Raoul C, Estevez AG, Nishimune H, Cleveland DW, deLapeyriere O, Henderson CE, Haase G, Pettmann B (2002) Motoneuron death triggered by a specific pathway downstream of Fas. potentiation by ALS-linked SOD1 mutations. *Neuron* 35:1067-1083.
- Reaume AG, Elliott JL, Hoffman EK, Kowall NW, Ferrante RJ, Siwek DF, Wilcox HM, Flood DG, Beal MF, Brown RH, Jr., Scott RW, Snider WD (1996) Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat Genet* 13:43-47.
- Reddington M, Priller J, Treichel J, Haas C, Kreutzberg GW (1995) Astrocytes and microglia as potential targets for calcitonin gene related peptide in the central nervous system. *Can J Physiol Pharmacol* 73:1047-1049.
- Reglodi D, Lubics A, Kiss P, Lengvari I, Gaszner B, Toth G, Hegyi O, Tamas A (2006a) Effect of PACAP in 6-OHDA-induced injury of the substantia nigra in intact young and ovariectomized female rats. *Neuropeptides* 40:265-274.
- Reglodi D, Somogyvari-Vigh A, Vigh S, Maderdrut JL, Arimura A (2000) Neuroprotective effects of PACAP38 in a rat model of transient focal ischemia under various experimental conditions. *Ann N Y Acad Sci* 921:119-128.
- Reglodi D, Tamas A, Lengvari I, Toth G, Szalontay L, Lubics A (2006b) Comparative study of the effects of PACAP in young, aging, and castrated males in a rat model of Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 1070:518-524.
- Reglodi D, Tamas A, Lubics A, Szalontay L, Lengvari I (2004) Morphological and functional effects of PACAP in 6-hydroxydopamine-induced lesion of the substantia nigra in rats. *Regul Pept* 123:85-94.
- Reglodi D, Tamas A, Somogyvari-Vigh A, Szanto Z, Kertes E, Lenard L, Arimura A, Lengvari I (2002) Effects of pretreatment with PACAP on the infarct size and functional outcome in rat permanent focal cerebral ischemia. *Peptides* 23:2227-2234.
- Reiner A, Medina L, Figueredo-Cardenas G, Anfinson S (1995) Brainstem motoneuron pools that are selectively resistant in amyotrophic lateral sclerosis are preferentially enriched in parvalbumin: evidence from monkey brainstem for a calcium-mediated mechanism in sporadic ALS. *Exp Neurol* 131:239-250.
- Reubi JC, Laderach U, Waser B, Gebbers JO, Robberecht P, Laissue JA (2000) Vasoactive intestinal peptide/pituitary adenylate cyclase-activating peptide receptor subtypes in human tumors and their tissues of origin. *Cancer Res* 60:3105-3112.
- Ringer C, Weihe E, Schutz B (2009) Pre-symptomatic alterations in subcellular betaCGRP distribution in motor neurons precede astrogliosis in ALS mice. *Neurobiol Dis* 35:286-295.
- Robberecht P, Gourlet P, De Neef P, Woussen-Colle MC, Vandermeers-Piret MC, Vandermeers A, Christophe J (1992) Structural requirements for the occupancy of pituitary adenylate-cyclase-activating-peptide (PACAP) receptors and adenylate cyclase activation in human neuroblastoma NB-OK-1 cell membranes. Discovery of PACAP(6-38) as a potent antagonist. *Eur J Biochem* 207:239-246.
- Rohrenbeck AM, Bette M, Hooper DC, Nyberg F, Eiden LE, Dietzschold B, Weihe E (1999)

- Upregulation of COX-2 and CGRP expression in resident cells of the Borna disease virus-infected brain is dependent upon inflammation. *Neurobiol Dis* 6:15-34.
- Roman GC (1996) Neuroepidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: clues to aetiology and pathogenesis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 61:131-137.
- Ropelle ER, Flores MB, Cintra DE, Rocha GZ, Pauli JR, Morari J, de Souza CT, Moraes JC, Prada PO, Guadagnini D, Marin RM, Oliveira AG, Augusto TM, Carvalho HF, Velloso LA, Saad MJ, Carnevali JB (2010) IL-6 and IL-10 anti-inflammatory activity links exercise to hypothalamic insulin and leptin sensitivity through IKK β and ER stress inhibition. *PLoS Biol* 8.
- Rosen DR (1993) Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 364:362.
- Rosenfeld MG, Mermod JJ, Amara SG, Swanson LW, Sawchenko PE, Rivier J, Vale WW, Evans RM (1983) Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. *Nature* 304:129-135.
- Rossi D, Volterra A (2009) Astrocytic dysfunction: insights on the role in neurodegeneration. *Brain Res Bull* 80:224-232.
- Rothstein JD (2009) Current hypotheses for the underlying biology of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 65 Suppl 1:S3-9.
- Rothstein JD, Patel S, Regan MR, Haenggeli C, Huang YH, Bergles DE, Jin L, Dykes Hoberg M, Vidensky S, Chung DS, Toan SV, Bruijn LI, Su ZZ, Gupta P, Fisher PB (2005) Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature* 433:73-77.
- Rothstein JD, Van Kammen M, Levey AI, Martin LJ, Kuncel RW (1995) Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 38:73-84.
- Sabate MI, Stolarsky LS, Polak JM, Bloom SR, Varndell IM, Ghatge MA, Evans RM, Rosenfeld MG (1985) Regulation of neuroendocrine gene expression by alternative RNA processing. Colocalization of calcitonin and calcitonin gene-related peptide in thyroid C-cells. *J Biol Chem* 260:2589-2592.
- Saldanha J, Mahadevan D (1991) Molecular model-building of amylin and alpha-calcitonin gene-related polypeptide hormones using a combination of knowledge sources. *Protein Eng* 4:539-544.
- Salmon JE, Ng S, Yoo DH, Kim TH, Kim SY, Song GG (1999) Altered distribution of Fc γ receptor IIIa alleles in a cohort of Korean patients with lupus nephritis. *Arthritis Rheum* 42:818-819.
- Santello M, Volterra A (2009) Synaptic modulation by astrocytes via Ca $^{2+}$ -dependent glutamate release. *Neuroscience* 158:253-259.
- Sarasa M, Terrado J, Mengod G, Climent S, Muniesa P, Palacios JM (1996) Differential expression of alpha-CGRP and beta-CGRP genes within hypoglossal motoneurons in response to axotomy. *Brain Res Mol Brain Res* 35:269-277.
- Sasaki S, Aoki M, Nagai M, Kobayashi M, Itoyama Y (2009) Mitochondrial alterations in transgenic mice with an H46R mutant Cu/Zn superoxide dismutase gene. *J Neuropathol Exp Neurol* 68:365-373.
- Sasaki S, Iwata M (1996) Ultrastructural study of synapses in the anterior horn neurons of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* 204:53-56.
- Schafer MK, Bette M, Romeo H, Schwaebler W, Weihe E (1994) Localization of kappa-opioid receptor mRNA in neuronal subpopulations of rat sensory ganglia and spinal cord. *Neurosci Lett* 167:137-140.
- Schipper HM (1996) Astrocytes, brain aging, and neurodegeneration. *Neurobiol Aging* 17:467-480.
- Schutz B (2005) The Oral Antidiabetic Pioglitazone Protects from Neurodegeneration and Amyotrophic Lateral Sclerosis-Like Symptoms in Superoxide Dismutase-G93A Transgenic Mice. *Journal of Neuroscience* 25:7805-7812.
- Schutz B, Mauer D, Salmon AM, Changeux JP, Zimmer A (2004) Analysis of the cellular expression pattern of beta-CGRP in alpha-CGRP-deficient mice. *J Comp Neurol* 476:32-43.
- Schutz B, Reimann J, Dumitrescu-Ozimek L, Kappes-Horn K, Landreth GE, Schurmann B, Zimmer A, Heneka MT (2005) The oral antidiabetic pioglitazone protects from neurodegeneration and amyotrophic lateral sclerosis-like symptoms in superoxide dismutase-G93A transgenic mice. *J Neurosci* 25:7805-7812.
- Sexton PM, McKenzie JS, Mendelsohn FA (1988) Evidence for a new subclass of calcitonin/calcitonin gene-related peptide binding site in rat brain. *Neurochem Int* 12:323-335.
- Sexton PM, Morfis M, Tilakaratne N, Hay DL, Udawela M, Christopoulos G, Christopoulos A (2006) Complexing receptor pharmacology: modulation of family B G protein-coupled receptor function by RAMPs. *Ann N Y Acad Sci* 1070:90-104.
- Sherwood NM (2000) The Origin and Function of the Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP)/Glucagon Superfamily. *Endocrine Reviews* 21:619-670.
- Shibata N (2001) Transgenic mouse model for familial amyotrophic lateral sclerosis with superoxide dismutase-1 mutation. *Neuropathology* 21:82-92.
- Shioda S (2006) Pleiotropic Functions of PACAP in the CNS: Neuroprotection and Neurodevelopment. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1070:550-560.
- Shoge K, Mishima HK, Saitoh T, Ishihara K, Tamura Y, Shiomi H, Sasa M (1999) Attenuation by PACAP of glutamate-induced neurotoxicity in cultured retinal neurons. *Brain Res* 839:66-73.
- Skoglosa Y, Lewen A, Takei N, Hillered L, Lindholm D (1999) Regulation of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its receptor type 1 after traumatic brain injury: comparison with brain-derived neurotrophic factor and the induction of neuronal cell death. *Neuroscience* 90:235-247.
- Snyder SK, Byrnes KR, Borke RC, Sanchez A, Anders JJ (2002) Quantitation of calcitonin gene-related peptide mRNA and neuronal cell death in facial motor nuclei following

- axotomy and 633 nm low power laser treatment. *Lasers Surg Med* 31:216-222.
- Sofroniew MV, Vinters HV (2010) Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119:7-35.
- Somogyvari-Vigh A, Pan W, Reglodi D, Kastin AJ, Arimura A (2000) Effect of middle cerebral artery occlusion on the passage of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide across the blood-brain barrier in the rat. *Regul Pept* 91:89-95.
- Spengler D, Waeber C, Pantaloni C, Holsboer F, Bockaert J, Seeburg PH, Journot L (1993) Differential signal transduction by five splice variants of the PACAP receptor. *Nature* 365:170-175.
- Sreedharan SP, Patel DR, Huang JX, Goetzl EJ (1993) Cloning and functional expression of a human neuroendocrine vasoactive intestinal peptide receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 193:546-553.
- Streit WJ (2002a) Microglia and the response to brain injury. *Ernst Schering Res Found Workshop* 11-24.
- Streit WJ (2002b) Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia* 40:133-139.
- Stumm R, Kolodziej A, Prinz V, Endres M, Wu DF, Holt V (2007) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is up-regulated in cortical pyramidal cells after focal ischemia and protects neurons from mild hypoxic/ischemic damage. *J Neurochem* 103:1666-1681.
- Sumi H, Nagano S, Fujimura H, Kato S, Sakoda S (2006) Inverse correlation between the formation of mitochondria-derived vacuoles and Lewy-body-like hyaline inclusions in G93A superoxide-dismutase-transgenic mice. *Acta Neuropathol* 112:52-63.
- Suzuki R (2003) Expression of the receptor for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PAC1-R) in reactive astrocytes. *Molecular Brain Research* 115:10-20.
- Svoboda M, Tastenoy M, Van Rampelbergh J, Goossens JF, De Neef P, Waelbroeck M, Robberecht P (1994) Molecular cloning and functional characterization of a human VIP receptor from SUP-T1 lymphoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 205:1617-1624.
- Takahashi K, Nakayama M, Totsune K, Murakami O, Sone M, Kitamuro T, Yoshinoya A, Shibahara S (2000) Increased secretion of adrenomedullin from cultured human astrocytes by cytokines. *J Neurochem* 74:99-103.
- Takhshid MA, Poyner DR, Chabot JG, Fournier A, Ma W, Zheng WH, Owji AA, Quirion R (2006) Characterization and effects on cAMP accumulation of adrenomedullin and calcitonin gene-related peptide (CGRP) receptors in dissociated rat spinal cord cell culture. *Br J Pharmacol* 148:459-468.
- Tan YV, Abad C, Lopez R, Dong H, Liu S, Lee A, Gomariz RP, Leceta J, Waschek JA (2009) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is an intrinsic regulator of Treg abundance and protects against experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:2012-2017.
- Tanaka J, Nakamura H, Tabuchi Y, Takahashi K (1984) Familial amyotrophic lateral sclerosis: features of multisystem degeneration. *Acta Neuropathol* 64:22-29.
- Tateishi T, Hokonohara T, Yamasaki R, Miura S, Kikuchi H, Iwaki A, Tashiro H, Furuya H, Nagara Y, Ohyagi Y, Nukina N, Iwaki T, Fukumaki Y, Kira JI (2010) Multiple system degeneration with basophilic inclusions in Japanese ALS patients with FUS mutation. *Acta Neuropathol* 119:355-364.
- Tatsuno I, Somogyvari-Vigh A, Arimura A (1994) Developmental changes of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and its receptor in the rat brain. *Peptides* 15:55-60.
- Tomimatsu N, Arakawa Y (2008) Survival-promoting activity of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the presence of phosphodiesterase inhibitors on rat motoneurons in culture: cAMP-protein kinase A-mediated survival. *J Neurochem* 107:628-635.
- Tran Q, Coleman TP, Roesser JR (2003) Human transformer 2beta and SRp55 interact with a calcitonin-specific splice enhancer. *Biochim Biophys Acta* 1625:141-152.
- Tran Q, Roesser JR (2003) SRp55 is a regulator of calcitonin/CGRP alternative RNA splicing. *Biochemistry* 42:951-957.
- Trang T, Quirion R, Jhamandas K (2005) The spinal basis of opioid tolerance and physical dependence: Involvement of calcitonin gene-related peptide, substance P, and arachidonic acid-derived metabolites. *Peptides* 26:1346-1355.
- Tsujikawa K, Yayama K, Hayashi T, Matsushita H, Yamaguchi T, Shigeno T, Ogitani Y, Hirayama M, Kato T, Fukada S, Takatori S, Kawasaki H, Okamoto H, Ikawa M, Okabe M, Yamamoto H (2007) Hypertension and dysregulated proinflammatory cytokine production in receptor activity-modifying protein 1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:16702-16707.
- Turner MR, Cagnin A, Turkheimer FE, Miller CC, Shaw CE, Brooks DJ, Leigh PN, Banati RB (2004) Evidence of widespread cerebral microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis: an [¹¹C](R)-PK11195 positron emission tomography study. *Neurobiol Dis* 15:601-609.
- Uchida D, Arimura A, Somogyvari-Vigh A, Shioda S, Banks WA (1996) Prevention of ischemia-induced death of hippocampal neurons by pituitary adenylate cyclase activating polypeptide. *Brain Res* 736:280-286.
- Ueda T, Ugawa S, Saishin Y, Shimada S (2001) Expression of receptor-activity modifying protein (RAMP) mRNAs in the mouse brain. *Brain Res Mol Brain Res* 93:36-45.
- Umeda Y, Arisawa M (1989) Characterization of the calcitonin gene-related peptide receptor in mouse T lymphocytes. *Neuropeptides* 14:237-242.
- Urushitani M, Sik A, Sakurai T, Nukina N, Takahashi R, Julien JP (2006) Chromogranin-mediated secretion of mutant superoxide dismutase proteins linked to amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* 9:108-118.
- Van Damme P, Dewil M, Robberecht W, Van Den Bosch L (2005) Excitotoxicity and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurodegenerative Diseases* 2:147-159.
- Van Damme P, Robberecht W (2009) Recent advances in motor neuron disease. *Curr Opin Neurol* 22:486-492.

- van der Graaff MM, de Jong JM, Baas F, de Visser M (2009) Upper motor neuron and extra-motor neuron involvement in amyotrophic lateral sclerosis: a clinical and brain imaging review. *Neuromuscul Disord* 19:53-58.
- van Rossum D, Hanisch UK, Quirion R (1997) Neuroanatomical localization, pharmacological characterization and functions of CGRP, related peptides and their receptors. *Neurosci Biobehav Rev* 21:649-678.
- Vanselow BK, Keller BU (2000) Calcium dynamics and buffering in oculomotor neurones from mouse that are particularly resistant during amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-related motoneurone disease. *J Physiol* 525 Pt 2:433-445.
- Vaudry D, Falluel-Morel A, Basille M, Pamantung TF, Fontaine M, Fournier A, Vaudry H, Gonzalez BJ (2003) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide prevents C2-ceramide-induced apoptosis of cerebellar granule cells. *J Neurosci Res* 72:303-316.
- Vaudry D, Falluel-Morel A, Bourgault S, Basille M, Burel D, Wurtz O, Fournier A, Chow BKC, Hashimoto H, Galas L, Vaudry H (2009) Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide and Its Receptors: 20 Years after the Discovery. *Pharmacological Reviews* 61:283-357.
- Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Yon L, Fournier A, Vaudry H (2000) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions. *Pharmacol Rev* 52:269-324.
- Vaudry D, Rousselle C, Basille M, Falluel-Morel A, Pamantung TF, Fontaine M, Fournier A, Vaudry H, Gonzalez BJ (2002) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide protects rat cerebellar granule neurons against ethanol-induced apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:6398-6403.
- Vielhaber S, Kunz D, Winkler K, Wiedemann FR, Kirches E, Feistner H, Heinze HJ, Elger CE, Schubert W, Kunz WS (2000) Mitochondrial DNA abnormalities in skeletal muscle of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 123 (Pt 7):1339-1348.
- Wagner JA (1996) Is IL-6 both a cytokine and a neurotrophic factor? *J Exp Med* 183:2417-2419.
- Wainwright DA, Xin J, Sanders VM, Jones KJ (2008) Differential actions of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and interferon gamma on Th2- and Th1-associated chemokine expression in cultured murine microglia. *J Neurodegener Regen* 1:31-34.
- Walker CS, Conner AC, Poyner DR, Hay DL (2010) Regulation of signal transduction by calcitonin gene-related peptide receptors. *Trends Pharmacol Sci* 31:476-483.
- Wang G, Pan J, Tan YY, Sun XK, Zhang YF, Zhou HY, Ren RJ, Wang XJ, Chen SD (2008) Neuroprotective effects of PACAP27 in mice model of Parkinson's disease involved in the modulation of K(ATP) subunits and D2 receptors in the striatum. *Neuropeptides* 42:267-276.
- Wang H, Xing L, Li W, Hou L, Guo J, Wang X (2002) Production and secretion of calcitonin gene-related peptide from human lymphocytes. *J Neuroimmunol* 130:155-162.
- Wang X, Xing L, Xing Y, Tang Y, Han C (1999) Identification and characterization of immunoreactive calcitonin gene-related peptide from lymphocytes of the rat. *J Neuroimmunol* 94:95-102.
- Wang Z, Ma W, Chabot JG, Quirion R (2010) Calcitonin gene-related peptide as a regulator of neuronal CaMKII-CREB, microglial p38-NFkappaB and astroglial ERK-Stat1/3 cascades mediating the development of tolerance to morphine-induced analgesia. *Pain* 151:194-205.
- Watanabe M, Dykes-Hoberg M, Culotta VC, Price DL, Wong PC, Rothstein JD (2001) Histological evidence of protein aggregation in mutant SOD1 transgenic mice and in amyotrophic lateral sclerosis neural tissues. *Neurobiol Dis* 8:933-941.
- Weihe E (1992) Neurochemical anatomy of the mammalian spinal cord: functional implications. *Ann Anat* 174:89-118.
- Weihe E, Bette M, Preuss MA, Faber M, Schafer MK, Rehnelt J, Schnell MJ, Dietzschold B (2008) Role of virus-induced neuropeptides in the brain in the pathogenesis of rabies. *Dev Biol (Basel)* 131:73-81.
- Weihe E, Nohr D, Michel S, Muller S, Zentel HJ, Fink T, Krekel J (1991) Molecular anatomy of the neuro-immune connection. *Int J Neurosci* 59:1-23.
- Weihe E, Nohr D, Schafer MK, Persson S, Ekstrom G, Kallstrom J, Nyberg F, Post C (1995) Calcitonin gene related peptide gene expression in collagen-induced arthritis. *Can J Physiol Pharmacol* 73:1015-1019.
- Weydt P, Hong SY, Kliot M, Moller T (2003) Assessing disease onset and progression in the SOD1 mouse model of ALS. *NeuroReport* 14:1051-1054.
- Weydt P, Yuen EC, Ransom BR, Moller T (2004) Increased cytotoxic potential of microglia from ALS-transgenic mice. *Glia* 48:179-182.
- Williams TM, Burgey CS, Salvatore CA (2009) Calcitonin gene-related peptide receptor antagonists for the treatment of migraine. *Prog Med Chem* 47:1-35.
- Wimalawansa SJ (1996) Calcitonin gene-related peptide and its receptors: molecular genetics, physiology, pathophysiology, and therapeutic potentials. *Endocr Rev* 17:533-585.
- Wolf HK, Crain BJ, Siddique T (1991) Degeneration of the substantia nigra in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Neuropathol* 10:291-296.
- Wong PC, Pardo CA, Borchelt DR, Lee MK, Copeland NG, Jenkins NA, Sisodia SS, Cleveland DW, Price DL (1995) An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron* 14:1105-1116.
- Wu DC, Re DB, Nagai M, Ischiropoulos H, Przedborski S (2006) The inflammatory NADPH oxidase enzyme modulates motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:12132-12137.
- Xiao S, McLean J, Robertson J (2006) Neuronal intermediate filaments and ALS: a new

- look at an old question. *Biochim Biophys Acta* 1762:1001-1012.
- Xu YF, Gendron TF, Zhang YJ, Lin WL, D'Alton S, Sheng H, Casey MC, Tong J, Knight J, Yu X, Rademakers R, Boylan K, Hutton M, McGowan E, Dickson DW, Lewis J, Petrucelli L (2010) Wild-type human TDP-43 expression causes TDP-43 phosphorylation, mitochondrial aggregation, motor deficits, and early mortality in transgenic mice. *J Neurosci* 30:10851-10859.
- Yamamoto K, Hashimoto H, Hagihara N, Nishino A, Fujita T, Matsuda T, Baba A (1998) Cloning and characterization of the mouse pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) gene. *Gene* 211:63-69.
- Yamanaka K, Chun SJ, Boillee S, Fujimori-Tonou N, Yamashita H, Gutmann DH, Takahashi R, Misawa H, Cleveland DW (2008) Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* 11:251-253.
- Yang C, Tan W, Whittle C, Qiu L, Cao L, Akbarian S, Xu Z (2010) The C-terminal TDP-43 fragments have a high aggregation propensity and harm neurons by a dominant-negative mechanism. *PLoS One* 5:e15878.
- Yang S, Yang J, Yang Z, Chen P, Fraser A, Zhang W, Pang H, Gao X, Wilson B, Hong JS, Block ML (2006a) Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) 38 and PACAP4-6 Are Neuroprotective through Inhibition of NADPH Oxidase: Potent Regulators of Microglia-Mediated Oxidative Stress. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 319:595-603.
- Yang S, Yang J, Yang Z, Chen P, Fraser A, Zhang W, Pang H, Gao X, Wilson B, Hong JS, Block ML (2006b) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) 38 and PACAP4-6 are neuroprotective through inhibition of NADPH oxidase: potent regulators of microglia-mediated oxidative stress. *J Pharmacol Exp Ther* 319:595-603.
- Yaraee R, Ebtekar M, Ahmadiani A, Sabahi F (2005) Effect of neuropeptides (SP and CGRP) on antigen presentation by macrophages. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 27:395-404.
- Yasukawa H, Ohishi M, Mori H, Murakami M, Chinen T, Aki D, Hanada T, Takeda K, Akira S, Hoshijima M, Hirano T, Chien KR, Yoshimura A (2003) IL-6 induces an anti-inflammatory response in the absence of SOCS3 in macrophages. *Nat Immunol* 4:551-556.
- Yeung VT, Ho SK, Nicholls MG, Cockram CS (1996) Adrenomedullin, a novel vasoactive hormone, binds to mouse astrocytes and stimulates cyclic AMP production. *J Neurosci Res* 46:330-335.
- Yiangou Y, Facer P, Durrenberger P, Chessell IP, Naylor A, Bountra C, Banati RR, Anand P (2006) COX-2, CB2 and P2X7-immunoreactivities are increased in activated microglial cells/macrophages of multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis spinal cord. *BMC Neurol* 6:12.
- Zang DW, Yang Q, Wang HX, Egan G, Lopes EC, Cheema SS (2004) Magnetic resonance imaging reveals neuronal degeneration in the brainstem of the superoxide dismutase 1 transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurosci* 20:1745-1751.
- Zhang Y, Malmberg AB, Sjolund B, Yaksh TL (1996) The effect of pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP) on the nociceptive formalin test. *Neurosci Lett* 207:187-190.
- Zhou CJ, Kikuyama S, Shibamura M, Hirabayashi T, Nakajo S, Arimura A, Shioda S (2000) Cellular distribution of the splice variants of the receptor for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PAC(1)-R) in the rat brain by in situ RT-PCR. *Brain Res Mol Brain Res* 75:150-158.
- Zhou X, Rodriguez WI, Casillas RA, Ma V, Tam J, Hu Z, Lelievre V, Chao A, Waschek JA (1999) Axotomy-induced changes in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and PACAP receptor gene expression in the adult rat facial motor nucleus. *J Neurosci Res* 57:953-961.
- Zigmond RE, Sun Y (1997) Regulation of neuropeptide expression in sympathetic neurons. Paracrine and retrograde influences. *Ann N Y Acad Sci* 814:181-197.

5.2 Datensätze

5.2.1 Effekt der α CGRP-Deletion im SOD1-Mausmodell

Tabelle 5.2.1.1: Relatives Körpergewicht im Zeitverlauf. BW: Körpergewicht (body weight), Links: Mittelwert +/- Standardabweichung in % relativ zum postnatalen Tag (P) 49. Rechts: Signifikanzniveaus der Varianzanalyse (Zweiwege-ANOVA). WT: wildtyp, TG: SOD1-transgen, KO: α CGRP-defizient.

BW	WT-WT	WT-KO	TG-WT	TG-KO	WT:WT vs. WT:KO	WT:WT vs. TG:WT	WT:KO vs. TG:KO	TG:WT vs. TG:KO
P49	100,0 +/- 0,0	100,0 +/- 0,0	100,0 +/- 0,0	100,0 +/- 0,0	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P56	104,6 +/- 4,0	103,2 +/- 5,1	103,4 +/- 3,1	104,8 +/- 5,1	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P63	108,1 +/- 4,5	105,8 +/- 5,8	105,1 +/- 4,3	107,1 +/- 6,1	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P70	110,4 +/- 4,0	108,2 +/- 5,4	107,0 +/- 6,3	107,0 +/- 6,2	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P77	113,6 +/- 5,9	111,9 +/- 6,9	108,6 +/- 6,0	109,1 +/- 7,1	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P84	116,0 +/- 4,9	114,4 +/- 6,6	109,0 +/- 6,3	109,2 +/- 6,4	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P91	118,1 +/- 6,2	116,6 +/- 6,5	111,7 +/- 6,9	109,9 +/- 6,0	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P98	120,2 +/- 6,4	118,2 +/- 7,7	111,0 +/- 5,8	110,7 +/- 7,1	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P105	121,5 +/- 6,9	119,0 +/- 8,1	111,1 +/- 6,0	110,0 +/- 6,7	P > 0.05	P > 0.05	P < 0.001	P < 0.001
P112	123,9 +/- 6,6	122,6 +/- 7,1	109,2 +/- 5,8	108,4 +/- 7,3	P > 0.05	P > 0.05	P < 0.001	P < 0.001
P119	125,1 +/- 6,8	122,0 +/- 7,3	105,4 +/- 6,1	105,0 +/- 8,7	P > 0.05	P > 0.05	P < 0.001	P < 0.001
P126	127,7 +/- 6,3	123,2 +/- 8,2	102,2 +/- 6,1	102,0 +/- 8,7	P > 0.05	P > 0.05	P < 0.001	P < 0.001
P133	129,5 +/- 8,3	124,2 +/- 7,8	96,2 +/- 7,5	97,7 +/- 10,8	P > 0.05	P > 0.05	P < 0.001	P < 0.001
P140	130,5 +/- 8,5	124,0 +/- 8,5	90,0 +/- 8,2	97,7 +/- 11,0	P > 0.05	P > 0.05	P < 0.001	P < 0.001
P147	131,5 +/- 9,1	125,9 +/- 8,7	88,8 +/- 4,8	95,4 +/- 13,7	P > 0.05	P > 0.05	P < 0.001	P < 0.001
P154	130,1 +/- 8,6	127,0 +/- 11,8	90,3 +/- 7,4	95,3 +/- 10,6	P > 0.05	P > 0.05	P < 0.001	P < 0.001

Tabelle 5.2.1.2: Kraftausdauer der Hinterpfote im Zeitverlauf. PAGE: Kraftausdauer (paw grip endurance), Links: Mittelwert +/- Standardabweichung in Sekunden. Rechts: Signifikanzniveaus der Varianzanalyse (Zweiwege-ANOVA). WT: wildtyp, TG: SOD1-transgen, α CGRP-defizient.

PAGE	WT-WT	WT-KO	TG-WT	TG-KO	WT:WT vs. WT:KO	WT:WT vs. TG:WT	WT:KO vs. TG:KO	TG:WT vs. TG:KO
P49	90,0 +/- 0,0	90,0 +/- 0,0	90,0 +/- 0,0	90,0 +/- 0,0	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P56	90,0 +/- 0,0	90,0 +/- 0,0	90,0 +/- 0,0	90,0 +/- 0,0	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P63	90,0 +/- 0,0	90,0 +/- 0,0	89,6 +/- 2,0	87,3 +/- 7,7	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P70	90,0 +/- 0,0	90,0 +/- 0,0	88,6 +/- 7,0	82,1 +/- 19,2	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P77	90,0 +/- 0,0	90,0 +/- 0,0	88,5 +/- 5,6	82,8 +/- 17,2	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P84	90,0 +/- 0,0	90,0 +/- 0,0	85,2 +/- 14,2	80,4 +/- 23,7	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P91	90,0 +/- 0,0	90,0 +/- 0,0	79,4 +/- 19,3	73,6 +/- 26,5	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P98	90,0 +/- 0,0	90,0 +/- 0,0	72,1 +/- 23,0	63,5 +/- 31,2	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P105	90,0 +/- 0,0	90,0 +/- 0,0	57,6 +/- 33,6	49,6 +/- 32,7	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P112	90,0 +/- 0,0	90,0 +/- 0,0	43,2 +/- 33,9	37,1 +/- 30,6	P > 0.05	P > 0.05	P < 0.001	P < 0.001
P119	90,0 +/- 0,0	90,0 +/- 0,0	21,6 +/- 24,2	27,8 +/- 31,2	P > 0.05	P > 0.05	P < 0.001	P < 0.001
P126	90,0 +/- 0,0	90,0 +/- 0,0	8,6 +/- 14,3	10,9 +/- 15,7	P > 0.05	P > 0.05	P < 0.001	P < 0.001
P133	90,0 +/- 0,0	90,0 +/- 0,0	1,6 +/- 7,1	6,5 +/- 11,2	P > 0.05	P > 0.05	P < 0.001	P < 0.001
P140	90,0 +/- 0,0	90,0 +/- 0,0	0,0 +/- 0,0	1,9 +/- 4,5	P > 0.05	P > 0.05	P < 0.001	P < 0.001
P147	90,0 +/- 0,0	90,0 +/- 0,0	0,0 +/- 0,0	0,0 +/- 0,0	P > 0.05	P > 0.05	P < 0.001	P < 0.001
P154	90,0 +/- 0,0	90,0 +/- 0,0	0,0 +/- 0,0	0,0 +/- 0,0	P > 0.05	P > 0.05	P < 0.001	P < 0.001

5.2.2 Quantifizierung Motoneurontypen

Tabelle 5.2.2.: Relative Anzahl der CGRP-abhängigen Motoneuronen-Typen. P: Postnataler Tag, WT: Wildtyp, TG:Transgen, Mittelwerte [%] +/- Standardabweichung. WT jeweils als 100% gesetzt, TG desselben Motoneurontyps desselben Alters relativ dazu. T-TEST: P-Werte des Vergleichs zwischen WT und TG desselben Motoneurontyps desselben Alters.

WT	P40	P60	P90	P130
highCGRP	100 +/- 17,9	100 +/- 22,4	100 +/- 17,7	100 +/- 28,8
lowCGRP	100 +/- 23,5	100 +/- 23,8	100 +/- 19,9	100 +/- 28,8
nonCGRP	100 +/- 25,6	100 +/- 29,0	100 +/- 21,1	100 +/- 26,3
TG	P40	P60	P90	P130
highCGRP	95,9 +/- 15,2	82,6 +/- 18,5	53,7 +/- 16,8	18,3 +/- 12,5
lowCGRP	109,3 +/- 19,0	99,39 +/- 23,4	88,8 +/- 21,6	51,4 +/- 23,9
nonCGRP	106,9 +/- 15,6	104,0 +/- 27,5	94,2 +/- 23,0	97,6 +/- 35,6
T-TEST	P40	P60	P90	P130
highCGRP	P > 0.05	P < 0.001	P < 0.001	P < 0.001
lowCGRP	P > 0.05	P > 0.05	P < 0.01	P < 0.001
nonCGRP	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05

5.2.3 Untersuchung von Geschlechtsunterschieden im SOD1 Mausmodell

Tabelle 5.2.3.1: Relatives Körpergewicht im Zeitverlauf. BW: Körpergewicht (body weight), Links: Mittelwert +/- Standardabweichung in % relativ zum postnatalen Tag (P) 49. Rechts: Signifikanzniveaus der Varianzanalyse (Zweiwege-ANOVA). WT: wildtyp, TG: SOD1-transgen, m: männlich, f: weiblich.

BW	WT m	WT f	TG m	TG f	WT m vs. WT f	WT m vs. TG m	WT f vs. TG f	TG m vs. TG f
P49	100,0 +/- 0,0	100,0 +/- 0,0	100,0 +/- 0,0	100,0 +/- 0,0	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P56	103,7 +/- 3,8	105,3 +/- 6,4	101,6 +/- 5,8	104,2 +/- 9,2	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P63	106,7 +/- 5,5	105,8 +/- 7,6	105,3 +/- 5,5	106,3 +/- 7,0	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P70	109,2 +/- 6,8	109,7 +/- 9,8	106,0 +/- 6,5	109,3 +/- 6,4	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P77	112,2 +/- 7,2	111,0 +/- 8,1	107,5 +/- 6,4	112,6 +/- 7,1	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P84	114,7 +/- 8,6	114,5 +/- 6,7	108,5 +/- 8,0	113,1 +/- 7,9	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P91	116,0 +/- 9,5	117,5 +/- 9,8	106,5 +/- 11,0	113,2 +/- 11,1	P > 0.05	P < 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P98	117,6 +/- 8,9	117,4 +/- 8,2	106,9 +/- 8,3	113,6 +/- 8,3	P > 0.05	P < 0.01	P > 0.05	P > 0.05
P105	118,6 +/- 9,5	120,2 +/- 8,7	106,0 +/- 8,4	113,8 +/- 10,7	P > 0.05	P < 0.001	P > 0.05	P > 0.05
P112	121,1 +/- 9,1	122,2 +/- 11,5	103,3 +/- 7,8	110,2 +/- 9,4	P > 0.05	P < 0.001	P < 0.001	P > 0.05
P119	120,8 +/- 11,1	122,2 +/- 12,8	98,6 +/- 7,5	108,3 +/- 10,6	P > 0.05	P < 0.001	P < 0.001	P < 0.05
P126	123,5 +/- 9,8	122,5 +/- 13,9	90,3 +/- 9,5	101,9 +/- 10,7	P > 0.05	P < 0.001	P < 0.001	P < 0.01
P133	125,2 +/- 9,4	122,8 +/- 12,8	88,5 +/- 8,6	99,9 +/- 9,6	P > 0.05	P < 0.001	P < 0.001	P < 0.01
P140	124,6 +/- 8,2	126,2 +/- 16,0	85,6 +/- 9,7	97,6 +/- 9,7	P > 0.05	P < 0.001	P < 0.001	P < 0.01
P147	127,8 +/- 11,7	126,9 +/- 15,3	85,2 +/- 9,5	95,5 +/- 11,0	P > 0.05	P < 0.001	P < 0.001	P < 0.05

Tabelle 5.2.3.2: Kraftausdauer der Hinterpfote im Zeitverlauf. PAGE: Kraftausdauer (paw grip endurance), Links: Mittelwert +/- Standardabweichung in Sekunden. Rechts: Signifikanzniveaus der Varianzanalyse (Zweiwege-ANOVA). WT: wildtyp, TG: SOD1-transgen, m: männlich, f: weiblich.

PAGE	WT m	WT f	TG m	TG f	WT m vs. WT f	WT m vs. TG m	WT f vs. TG f	TG m vs. TG f
P49	90,0 +/- 0,0	90,0 +/- 0,0	90,0 +/- 0,0	90,0 +/- 0,0	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P56	90,0 +/- 0,0	90,0 +/- 0,0	89,4 +/- 2,4	90,0 +/- 0,0	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P63	90,0 +/- 0,0	90,0 +/- 0,0	87,4 +/- 7,5	90,0 +/- 0,0	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P70	90,0 +/- 0,0	90,0 +/- 0,0	85,0 +/- 11,7	90,0 +/- 0,0	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P77	90,0 +/- 0,0	90,0 +/- 0,0	83,5 +/- 11,3	90,0 +/- 0,0	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P84	90,0 +/- 0,0	90,0 +/- 0,0	83,8 +/- 11,5	90,0 +/- 0,0	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P91	90,0 +/- 0,0	90,0 +/- 0,0	66,5 +/- 28,0	90,0 +/- 0,0	P > 0.05	P < 0.001	P > 0.05	P < 0.001
P98	90,0 +/- 0,0	90,0 +/- 0,0	56,8 +/- 31,6	89,7 +/- 1,3	P > 0.05	P < 0.001	P > 0.05	P < 0.001
P105	90,0 +/- 0,0	90,0 +/- 0,0	44,7 +/- 32,4	83,4 +/- 18,1	P > 0.05	P < 0.001	P > 0.05	P < 0.001
P112	90,0 +/- 0,0	90,0 +/- 0,0	26,5 +/- 32,5	70,3 +/- 29,1	P > 0.05	P < 0.001	P < 0.001	P < 0.001
P119	90,0 +/- 0,0	90,0 +/- 0,0	8,5 +/- 12,7	50,9 +/- 35,8	P > 0.05	P < 0.001	P < 0.001	P < 0.001
P126	90,0 +/- 0,0	90,0 +/- 0,0	2,1 +/- 5,0	21,3 +/- 31,7	P > 0.05	P < 0.001	P < 0.001	P < 0.001
P133	90,0 +/- 0,0	90,0 +/- 0,0	0,6 +/- 2,4	5,3 +/- 8,7	P > 0.05	P < 0.001	P < 0.001	P > 0.05
P140	90,0 +/- 0,0	90,0 +/- 0,0	0,0 +/- 0,0	1,9 +/- 7,5	P > 0.05	P < 0.001	P < 0.001	P > 0.05
P147	90,0 +/- 0,0	90,0 +/- 0,0	0,0 +/- 0,0	0,6 +/- 2,5	P > 0.05	P < 0.001	P < 0.001	P > 0.05

Tabelle 5.2.3.3: Maximalkraft der Vorderpfote im Zeitverlauf. GRIP: Maximalkraft (Griffstärke), Links: Mittelwert +/- Standardabweichung in Gramm. Rechts: Signifikanzniveaus der Varianzanalyse (Zweiwege-ANOVA). WT: wildtyp, TG: SOD1-transgen, m: männlich, f: weiblich.

GRIP	WT m	WT f	TG m	TG f	WT m vs. WT f	WT m vs. TG m	WT f vs. TG f	TG m vs. TG f
P49	91,4 +/- 11,7	81,3 +/- 14,2	89,4 +/- 13,4	77,5 +/- 14,4	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P56	89,1 +/- 13,8	82,6 +/- 10,5	84,7 +/- 13,7	75,6 +/- 18,2	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P63	87,7 +/- 14,1	81,7 +/- 11,9	89,4 +/- 11,4	75,0 +/- 15,5	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P70	88,2 +/- 13,0	79,1 +/- 13,5	78,2 +/- 17,8	80,6 +/- 16,9	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P77	91,4 +/- 10,4	78,3 +/- 12,3	78,8 +/- 15,0	73,8 +/- 19,6	P < 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P84	87,7 +/- 12,3	84,4 +/- 12,7	70,0 +/- 20,6	76,3 +/- 17,1	P > 0.05	P < 0.01	P > 0.05	P > 0.05
P91	89,6 +/- 11,7	81,7 +/- 13,4	70,6 +/- 21,4	73,1 +/- 18,5	P > 0.05	P < 0.01	P > 0.05	P > 0.05
P98	89,1 +/- 11,5	79,1 +/- 13,5	67,7 +/- 21,1	66,9 +/- 23,0	P > 0.05	P < 0.001	P > 0.05	P > 0.05
P105	86,8 +/- 13,2	78,7 +/- 13,6	54,7 +/- 16,6	64,4 +/- 18,6	P > 0.05	P < 0.001	P < 0.05	P > 0.05
P112	90,9 +/- 14,4	80,0 +/- 14,5	48,8 +/- 20,3	56,9 +/- 21,8	P > 0.05	P < 0.001	P < 0.001	P > 0.05
P119	89,6 +/- 12,1	78,7 +/- 14,9	26,5 +/- 15,8	39,4 +/- 22,9	P > 0.05	P < 0.001	P < 0.001	P > 0.05
P126	90,9 +/- 11,5	85,7 +/- 13,4	15,9 +/- 17,3	21,3 +/- 19,6	P > 0.05	P < 0.001	P < 0.001	P > 0.05
P133	92,7 +/- 9,8	89,1 +/- 12,0	11,8 +/- 16,3	13,1 +/- 20,2	P > 0.05	P < 0.001	P < 0.001	P > 0.05
P140	94,6 +/- 9,1	90,9 +/- 10,4	4,1 +/- 9,4	6,9 +/- 14,9	P > 0.05	P < 0.001	P < 0.001	P > 0.05
P147	91,4 +/- 10,4	89,1 +/- 12,0	1,2 +/- 4,9	0,6 +/- 2,5	P > 0.05	P < 0.001	P < 0.001	P > 0.05

Tabelle 5.2.3.4: Leckfrequenz der Zunge im Zeitverlauf. LICK: Lecktest, Links: Mittelwert +/- Standardabweichung in Hertz. Rechts: Signifikanzniveaus der Varianzanalyse (Zweiwege-ANOVA). WT: wildtyp, TG: SOD1-transgen, m: männlich, f: weiblich.

LICK	WT m	WT f	TG m	TG f	WT m vs. WT f	WT m vs. TG m	WT f vs. TG f	TG m vs. TG f
P49	9,6 +/- 1,0	9,9 +/- 0,7	9,2 +/- 0,7	9,0 +/- 0,6	P > 0.05	P > 0.05	P < 0.05	P > 0.05
P56	10,0 +/- 0,6	10,0 +/- 0,7	9,2 +/- 0,9	9,3 +/- 0,8	P > 0.05	P < 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P63	10,0 +/- 0,9	10,0 +/- 1,0	9,2 +/- 0,9	9,3 +/- 0,7	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P70	10,1 +/- 0,9	10,3 +/- 0,8	9,3 +/- 0,7	9,3 +/- 0,8	P > 0.05	P > 0.05	P < 0.01	P > 0.05
P77	10,2 +/- 0,7	10,3 +/- 0,6	9,5 +/- 0,6	9,0 +/- 0,6	P > 0.05	P > 0.05	P < 0.001	P > 0.05
P84	9,9 +/- 0,9	10,2 +/- 0,6	9,4 +/- 0,7	9,2 +/- 0,7	P > 0.05	P > 0.05	P < 0.01	P > 0.05
P91	10,0 +/- 0,8	10,2 +/- 0,7	9,0 +/- 1,0	9,3 +/- 0,5	P > 0.05	P < 0.01	P < 0.05	P > 0.05
P98	9,9 +/- 0,8	10,3 +/- 0,7	9,2 +/- 0,8	8,9 +/- 0,6	P > 0.05	P > 0.05	P < 0.001	P > 0.05
P105	10,2 +/- 0,8	10,2 +/- 0,7	9,0 +/- 0,7	8,8 +/- 0,9	P > 0.05	P < 0.001	P < 0.001	P > 0.05
P112	10,2 +/- 0,8	10,2 +/- 0,9	8,7 +/- 0,8	8,7 +/- 1,0	P > 0.05	P < 0.001	P < 0.001	P > 0.05
P119	10,2 +/- 0,7	10,2 +/- 0,9	8,2 +/- 0,8	8,3 +/- 1,0	P > 0.05	P < 0.001	P < 0.001	P > 0.05
P126	10,3 +/- 0,9	10,1 +/- 0,8	7,7 +/- 0,9	7,6 +/- 1,1	P > 0.05	P < 0.001	P < 0.001	P > 0.05
P133	10,3 +/- 0,6	10,1 +/- 0,8	7,1 +/- 0,9	7,5 +/- 1,1	P > 0.05	P < 0.001	P < 0.001	P > 0.05
P140	10,0 +/- 0,7	10,1 +/- 0,8	7,0 +/- 1,1	7,2 +/- 1,1	P > 0.05	P < 0.001	P < 0.001	P > 0.05
P147	10,2 +/- 0,7	10,1 +/- 0,8	7,0 +/- 1,1	7,0 +/- 0,9	P > 0.05	P < 0.001	P < 0.001	P > 0.05

Tabelle 5.2.3.5: Angleichung der Symptomstarts. BW: relatives Körpergewicht in %m PAGE: Kraftausdauer der Hinterpfote in Sekunden, GRIP: Maximalkraft der Vorderpfote in Gramm. LICK: Leckfrequenz, Mittelwerte +/- Standardabweichung bzw. Signifikanzniveaus der Varianzanalyse (Zweiwege-ANOVA). 0: Zeitpunkt des Symptomstarts, -1 bis -6: Woche vor Symptomstart, 1-7: Woche nach Symptomstart. WT: wildtyp, TG: SOD1-transgen, m: männlich, f: weiblich.

BW	TG m	TG f	TG m vs. TG f	GRIP	TG m	TG f	TG m vs. TG f
-6	102,1 +/- 4,4	105,9 +/- 7,4	P > 0.05	-5	87,1 +/- 12,6	77,5 +/- 16,5	P > 0.05
-5	104,6 +/- 5,5	110,0 +/- 6,8	P > 0.05	-4	86,5 +/- 11,7	80,6 +/- 13,4	P > 0.05
-4	106,3 +/- 6,7	110,9 +/- 10,7	P > 0.05	-3	82,4 +/- 13,9	81,9 +/- 13,3	P > 0.05
-3	106,3 +/- 7,6	112,4 +/- 8,1	P > 0.05	-2	81,2 +/- 18,7	81,9 +/- 13,8	P > 0.05
-2	107,0 +/- 9,2	113,5 +/- 9,8	P > 0.05	-1	73,5 +/- 18,4	77,5 +/- 13,4	P > 0.05
-1	106,5 +/- 9,9	112,6 +/- 7,3	P > 0.05	0	77,1 +/- 11,6	78,1 +/- 11,7	P > 0.05
0	110,2 +/- 7,6	117,7 +/- 7,6	P > 0.05	1	49,4 +/- 15,2	46,9 +/- 13,0	P > 0.05
1	105,5 +/- 7,4	111,8 +/- 7,4	P > 0.05	2	35,3 +/- 22,9	42,5 +/- 21,1	P > 0.05
2	102,6 +/- 6,8	108,1 +/- 8,8	P > 0.05	3	29,4 +/- 21,1	31,9 +/- 24,8	P > 0.05
3	98,3 +/- 8,8	102,9 +/- 8,8	P > 0.05	4	19,4 +/- 21,6	20,0 +/- 21,9	P > 0.05
4	92,5 +/- 11,3	100,3 +/- 10,7	P > 0.05	5	15,9 +/- 21,2	11,3 +/- 18,2	P > 0.05
5	89,1 +/- 10,1	97,9 +/- 10,4	P > 0.05	6	8,8 +/- 15,4	8,1 +/- 14,2	P > 0.05
6	87,0 +/- 10,4	96,5 +/- 11,0	P > 0.05	7	7,1 +/- 16,5	8,1 +/- 16,4	P > 0.05

PAGE	TG m	TG f	TG m vs. TG f	LICK	TG m	TG f	TG m vs. TG f
-5	90,0 +/- 0,0	90,0 +/- 0,0	P > 0.05	-5	9,4 +/- 0,7	9,1 +/- 0,7	P > 0.05
-4	89,4 +/- 2,4	90,0 +/- 0,0	P > 0.05	-4	9,6 +/- 0,6	9,2 +/- 0,8	P > 0.05
-3	88,2 +/- 7,3	90,0 +/- 0,0	P > 0.05	-3	9,6 +/- 0,7	8,9 +/- 0,6	P > 0.05
-2	90,0 +/- 0,0	90,0 +/- 0,0	P > 0.05	-2	9,1 +/- 0,5	8,9 +/- 0,8	P > 0.05
-1	89,4 +/- 2,4	89,7 +/- 1,3	P > 0.05	-1	9,1 +/- 0,9	8,9 +/- 0,7	P > 0.05
0	90,0 +/- 0,0	90,0 +/- 0,0	P > 0.05	0	9,5 +/- 0,6	9,2 +/- 0,6	P > 0.05
1	57,7 +/- 25,1	40,3 +/- 28,5	P > 0.05	1	8,2 +/- 0,5	8,3 +/- 0,6	P > 0.05
2	41,8 +/- 25,9	14,7 +/- 16,5	P < 0.05	2	8,0 +/- 0,6	8,1 +/- 0,7	P > 0.05
3	25,6 +/- 24,4	10,0 +/- 15,8	P > 0.05	3	7,7 +/- 1,0	7,9 +/- 0,7	P > 0.05
4	12,1 +/- 20,8	1,6 +/- 3,5	P > 0.05	4	7,4 +/- 1,0	7,3 +/- 0,8	P > 0.05
5	7,6 +/- 15,1	0,0 +/- 0,0	P > 0.05	5	7,2 +/- 1,1	7,1 +/- 0,9	P > 0.05
6	7,9 +/- 15,2	0,0 +/- 0,0	P > 0.05				
7	2,1 +/- 5,3	0,0 +/- 0,0	P > 0.05				

5.2.4 Effekt der RAMP1-Deletion im SOD1-Mausmodell

5.2.4.1 Dokumentation der klinischen Symptomatik

Tabelle 5.2.4.1: Relatives Körpergewicht im Zeitverlauf. BW: Körpergewicht (body weight), Links: Mittelwert +/- Standardabweichung in % relativ zum postnatalen Tag (P) 49. Rechts: Signifikanzniveaus der Varianzanalyse (Zweiwege-ANOVA). WT: wildtyp, KO: RAMP1-Knockout, TG: SOD1-transgen.

BW	WT-WT	WT-KO	TG-WT	TG-KO	WT:WT vs. WT:KO	WT:WT vs. TG:WT	WT:KO vs. TG:KO	TG:WT vs. TG:KO
P35	92,8 +/- 3,1	91,5 +/- 4,0	92,0 +/- 3,9	91,9 +/- 3,7	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P42	96,7 +/- 2,1	95,5 +/- 2,4	96,7 +/- 3,0	96,3 +/- 3,3	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P49	100,0 +/- 0,0	100,0 +/- 0,0	100,0 +/- 0,0	100,0 +/- 0,0	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P56	107,0 +/- 7,7	104,7 +/- 3,7	102,6 +/- 4,4	104,2 +/- 3,5	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P63	106,6 +/- 8,1	108,0 +/- 5,1	104,2 +/- 5,9	106,2 +/- 4,7	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P70	110,6 +/- 10,7	116,7 +/- 15,3	105,9 +/- 6,0	108,4 +/- 5,5	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P77	113,9 +/- 11,0	116,4 +/- 5,3	108,1 +/- 6,3	110,0 +/- 5,3	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P84	116,4 +/- 9,6	118,7 +/- 7,8	108,9 +/- 7,7	109,4 +/- 6,3	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P91	119,1 +/- 12,3	119,9 +/- 5,2	106,0 +/- 11,1	111,8 +/- 8,3	P > 0.05	P < 0.01	P > 0.05	P > 0.05
P98	120,3 +/- 11,9	120,7 +/- 7,2	107,1 +/- 8,1	111,1 +/- 7,5	P > 0.05	P < 0.01	P > 0.05	P > 0.05
P105	123,7 +/- 12,5	123,0 +/- 6,1	107,3 +/- 10,5	109,7 +/- 8,3	P > 0.05	P < 0.001	P < 0.01	P > 0.05
P112	124,8 +/- 16,4	123,7 +/- 7,3	106,0 +/- 9,3	107,0 +/- 7,5	P > 0.05	P < 0.001	P < 0.001	P > 0.05
P119	127,7 +/- 17,5	125,2 +/- 7,0	103,4 +/- 10,3	104,1 +/- 11,4	P > 0.05	P < 0.001	P < 0.001	P > 0.05
P126	129,4 +/- 18,3	125,8 +/- 7,1	94,6 +/- 11,5	95,5 +/- 11,4	P > 0.05	P < 0.001	P < 0.001	P > 0.05
P133	129,3 +/- 16,5	122,0 +/- 24,2	93,2 +/- 10,2	94,3 +/- 12,5	P > 0.05	P < 0.001	P < 0.001	P > 0.05
P140	133,1 +/- 19,2	128,3 +/- 9,2	89,6 +/- 11,0	89,1 +/- 8,4	P > 0.05	P < 0.001	P < 0.001	P > 0.05
P147	131,7 +/- 20,5	129,4 +/- 7,9	87,7 +/- 10,8	83,8 +/- 11,6	P > 0.05	P < 0.001	P < 0.001	P > 0.05
P153	126,3 +/- 15,9	129,2 +/- 7,5	86,8 +/- 10,1	81,7 +/- 12,7	P > 0.05	P < 0.001	P < 0.001	P > 0.05
P160	130,3 +/- 19,7	131,5 +/- 10,1	86,3 +/- 10,3	82,1 +/- 12,5	P > 0.05	P < 0.001	P < 0.001	P > 0.05

Tabelle 5.2.4.2: Kraftausdauer der Hinterpfote im Zeitverlauf. PAGE: Kraftausdauer (paw grip endurance), Links: Mittelwert +/- Standardabweichung in Sekunden. Rechts: Signifikanzniveaus der Varianzanalyse (Zweiwege-ANOVA). WT: wildtyp, KO: RAMP1-Knockout, TG: SOD1-transgen.

PAGE	WT-WT	WT-KO	TG-WT	TG-KO	WT:WT vs. WT:KO	WT:WT vs. TG-WT	WT:KO vs. TG:KO	TG:WT vs. TG:KO
P35	120,0 +/- 0,0	119,7 +/- 1,3	120,0 +/- 0,0	116,5 +/- 7,9	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05
P42	120,0 +/- 0,0	120,0 +/- 0,0	120,0 +/- 0,0	113,2 +/- 12,2	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05
P49	120,0 +/- 0,0	120,0 +/- 0,0	119,8 +/- 1,1	95,3 +/- 27,6	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05
P56	120,0 +/- 0,0	120,0 +/- 0,0	119,3 +/- 2,3	81,8 +/- 32,1	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05
P63	120,0 +/- 0,0	120,0 +/- 0,0	115,0 +/- 12,3	80,3 +/- 40,8	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05
P70	120,0 +/- 0,0	119,7 +/- 1,3	109,3 +/- 21,5	80,0 +/- 42,1	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05
P77	120,0 +/- 0,0	120,0 +/- 0,0	108,2 +/- 22,7	77,9 +/- 38,6	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05
P84	120,0 +/- 0,0	120,0 +/- 0,0	104,8 +/- 22,3	80,0 +/- 38,7	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05
P91	120,0 +/- 0,0	120,0 +/- 0,0	92,1 +/- 37,9	73,5 +/- 42,2	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05
P98	120,0 +/- 0,0	120,0 +/- 0,0	79,1 +/- 41,9	76,2 +/- 39,7	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05
P105	119,1 +/- 3,0	120,0 +/- 0,0	63,9 +/- 42,5	67,9 +/- 34,2	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05
P112	120,0 +/- 0,0	120,0 +/- 0,0	44,3 +/- 40,9	32,9 +/- 29,4	P > 0,05	P < 0,01	P < 0,01	P > 0,05
P119	120,0 +/- 0,0	120,0 +/- 0,0	28,4 +/- 35,4	19,4 +/- 22,0	P > 0,05	P < 0,001	P < 0,001	P > 0,05
P126	120,0 +/- 0,0	120,0 +/- 0,0	12,7 +/- 23,0	8,5 +/- 11,1	P > 0,05	P < 0,001	P < 0,001	P > 0,05
P133	120,0 +/- 0,0	120,0 +/- 0,0	4,1 +/- 7,8	2,4 +/- 6,4	P > 0,05	P < 0,001	P < 0,001	P > 0,05
P140	120,0 +/- 0,0	120,0 +/- 0,0	1,4 +/- 6,4	0,0 +/- 0,0	P > 0,05	P < 0,001	P < 0,001	P > 0,05
P147	120,0 +/- 0,0	120,0 +/- 0,0	0,5 +/- 2,1	0,0 +/- 0,0	P > 0,05	P < 0,001	P < 0,001	P > 0,05
P153	120,0 +/- 0,0	120,0 +/- 0,0	0,5 +/- 2,1	0,0 +/- 0,0	P > 0,05	P < 0,001	P < 0,001	P > 0,05
P160	120,0 +/- 0,0	120,0 +/- 0,0	0,0 +/- 0,0	0,0 +/- 0,0	P > 0,05	P < 0,001	P < 0,001	P > 0,05

Tabelle 5.2.4.3: Maximalkraft der Vorderpfote im Zeitverlauf. GRIP: Maximalkraft (Griffstärke), Links: Mittelwert +/- Standardabweichung in Gramm. Rechts: Signifikanzniveaus der Varianzanalyse (Zweiwege-ANOVA). WT: wildtyp, KO: RAMP1-Knockout, TG: SOD1-transgen.

GRIP	WT-WT	WT-KO	TG-WT	TG-KO	WT:WT vs. WT:KO	WT:WT vs. TG-WT	WT:KO vs. TG:KO	TG:WT vs. TG:KO
P35	87,3 +/- 9,0	88,0 +/- 9,4	76,8 +/- 11,7	91,2 +/- 7,8	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05
P42	92,7 +/- 6,5	95,3 +/- 8,3	76,8 +/- 17,3	91,8 +/- 8,8	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05	P < 0,05
P49	89,1 +/- 27,0	88,0 +/- 23,7	73,6 +/- 25,7	82,9 +/- 22,6	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05
P56	90,9 +/- 13,0	96,7 +/- 7,2	79,1 +/- 17,7	78,8 +/- 14,5	P > 0,05	P > 0,05	P < 0,05	P > 0,05
P63	85,5 +/- 13,7	84,7 +/- 17,3	78,6 +/- 15,5	70,6 +/- 19,8	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05
P70	89,1 +/- 12,2	92,7 +/- 9,6	71,4 +/- 14,9	62,4 +/- 17,5	P > 0,05	P < 0,05	P < 0,001	P > 0,05
P77	87,3 +/- 11,9	95,3 +/- 7,4	70,0 +/- 15,4	67,7 +/- 18,9	P > 0,05	P < 0,05	P < 0,001	P > 0,05
P84	93,6 +/- 10,3	88,7 +/- 13,0	66,8 +/- 15,9	63,5 +/- 17,3	P > 0,05	P < 0,001	P < 0,001	P > 0,05
P91	83,6 +/- 15,0	95,3 +/- 7,4	66,4 +/- 16,2	60,0 +/- 17,3	P > 0,05	P < 0,05	P < 0,001	P > 0,05
P98	84,6 +/- 17,5	94,0 +/- 9,1	60,9 +/- 17,7	60,0 +/- 17,0	P > 0,05	P < 0,001	P < 0,001	P > 0,05
P105	86,4 +/- 12,1	92,0 +/- 14,7	54,1 +/- 17,1	51,8 +/- 20,7	P > 0,05	P < 0,001	P < 0,001	P > 0,05
P112	87,3 +/- 15,6	94,7 +/- 9,2	49,1 +/- 18,5	38,8 +/- 19,3	P > 0,05	P < 0,001	P < 0,001	P > 0,05
P119	84,6 +/- 15,7	94,0 +/- 7,4	31,4 +/- 17,5	27,1 +/- 20,8	P > 0,05	P < 0,001	P < 0,001	P > 0,05
P126	92,7 +/- 7,9	95,3 +/- 5,2	23,6 +/- 17,1	17,1 +/- 18,3	P > 0,05	P < 0,001	P < 0,001	P > 0,05
P133	96,4 +/- 6,7	92,7 +/- 8,0	18,6 +/- 23,2	10,6 +/- 13,9	P > 0,05	P < 0,001	P < 0,001	P > 0,05
P140	96,4 +/- 9,2	93,3 +/- 11,1	5,5 +/- 12,2	2,4 +/- 5,6	P > 0,05	P < 0,001	P < 0,001	P > 0,05
P147	95,5 +/- 6,9	94,7 +/- 7,4	3,2 +/- 8,9	0,6 +/- 2,4	P > 0,05	P < 0,001	P < 0,001	P > 0,05
P153	98,2 +/- 4,0	98,0 +/- 4,1	0,9 +/- 2,9	0,0 +/- 0,0	P > 0,05	P < 0,001	P < 0,001	P > 0,05
P160	89,1 +/- 26,6	89,9 +/- 23,8	0,9 +/- 4,3	0,0 +/- 0,0	P > 0,05	P < 0,001	P < 0,001	P > 0,05

Tabelle 5.2.4.4: Leckfrequenz der Zunge im Zeitverlauf. LICK: Lecktest, Links: Mittelwert +/- Standardabweichung in Hertz. Rechts: Signifikanzniveaus der Varianzanalyse (Zweiwege-ANOVA). WT: wildtyp, KO: RAMP1-Knockout, TG: SOD1-transgen.

LICK	WT-WT	WT-KO	TG-WT	TG-KO	WT:WT vs. WT:KO	WT:WT vs. TG-WT	WT:KO vs. TG:KO	TG:WT vs. TG:KO
P35	9,5 +/- 0,4	10,2 +/- 0,6	9,2 +/- 0,5	9,4 +/- 0,5	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05
P42	9,7 +/- 0,7	10,1 +/- 0,6	9,4 +/- 0,6	9,6 +/- 0,7	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05
P49	9,6 +/- 0,5	10,1 +/- 0,8	9,3 +/- 0,6	9,4 +/- 0,7	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05
P56	9,7 +/- 0,7	10,2 +/- 0,6	9,6 +/- 0,7	9,7 +/- 0,6	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05
P63	9,8 +/- 0,8	10,4 +/- 0,6	9,5 +/- 0,7	9,6 +/- 0,7	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05
P70	9,6 +/- 0,5	10,4 +/- 0,7	9,5 +/- 0,7	9,9 +/- 0,8	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05
P77	9,8 +/- 0,7	10,4 +/- 0,7	9,4 +/- 0,5	9,7 +/- 0,6	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05
P84	10,0 +/- 0,8	10,3 +/- 0,6	9,4 +/- 0,8	9,6 +/- 0,7	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05
P91	9,8 +/- 0,7	10,1 +/- 0,8	9,2 +/- 0,9	9,6 +/- 0,9	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05
P98	10,2 +/- 0,8	10,2 +/- 0,7	9,1 +/- 0,8	9,4 +/- 0,6	P > 0,05	P < 0,01	P > 0,05	P > 0,05
P105	9,7 +/- 0,8	10,5 +/- 0,7	9,0 +/- 0,7	9,4 +/- 0,8	P > 0,05	P > 0,05	P < 0,01	P > 0,05
P112	9,6 +/- 0,9	10,1 +/- 0,5	8,8 +/- 0,7	9,1 +/- 1,1	P > 0,05	P > 0,05	P < 0,01	P > 0,05
P119	10,0 +/- 0,9	10,4 +/- 0,8	8,5 +/- 0,6	8,4 +/- 1,0	P > 0,05	P < 0,001	P < 0,001	P > 0,05
P126	9,8 +/- 0,8	10,6 +/- 0,7	7,8 +/- 0,9	8,1 +/- 1,1	P > 0,05	P < 0,001	P < 0,001	P > 0,05
P133	9,7 +/- 0,8	10,4 +/- 0,7	7,5 +/- 0,8	7,6 +/- 0,7	P > 0,05	P < 0,001	P < 0,001	P > 0,05
P140	9,3 +/- 0,7	10,2 +/- 0,8	7,2 +/- 1,1	7,2 +/- 1,0	P > 0,05	P < 0,001	P < 0,001	P > 0,05
P147	9,5 +/- 0,7	10,5 +/- 0,7	7,1 +/- 0,9	7,1 +/- 1,0	P < 0,05	P < 0,001	P < 0,001	P > 0,05
P153	9,4 +/- 0,7	10,1 +/- 0,6	6,9 +/- 1,0	6,8 +/- 1,1	P > 0,05	P < 0,001	P < 0,001	P > 0,05
P160	9,5 +/- 0,7	10,1 +/- 0,6	6,9 +/- 1,2	6,9 +/- 1,0	P > 0,05	P < 0,001	P < 0,001	P > 0,05

Tabelle 5.2.4.5: Angleichung der Symptomstarts. BW: relatives Körpergewicht in %m PAGE: Kraftausdauer der Hinterpfote in Sekunden, GRIP: Maximalkraft der Vorderpfote in Gramm. LICK: Leckfrequenz, Mittelwerte +/- Standardabweichung bzw. Signifikanzniveaus der Varianzanalyse (Zweiwege-ANOVA). 0: Zeitpunkt des Symptomstarts, -1 bis -6: Woche vor Symptomstart, 1-7: Woche nach Symptomstart. WT: wildtyp, KO: RAMP1-Knockout, TG: SOD1-transgen.

BW	TG-WT	TG-KO	TG:WT vs. TG:KO	PAGE	TG-WT	TG-KO	TG:WT vs. TG:KO
-6	102,9 +/- 5,0	103,4 +/- 7,4	P > 0,05	-2	120 +/- 0,0	120,0 +/- 0,0	P > 0,05
-5	106,0 +/- 6,1	106,0 +/- 6,0	P > 0,05	-1	119,8 +/- 0,0	120,0 +/- 0,0	P > 0,05
-4	106,8 +/- 8,9	109,1 +/- 7,0	P > 0,05	0	120,0 +/- 11,0	120,0 +/- 16,9	P > 0,05
-3	106,7 +/- 7,9	108,9 +/- 5,5	P > 0,05	1	96,6 +/- 26,5	96,2 +/- 32,2	P > 0,05
-2	108,3 +/- 8,7	111,7 +/- 6,5	P > 0,05	2	66,8 +/- 25,6	71,2 +/- 39,9	P > 0,05
-1	107,4 +/- 8,4	110,7 +/- 6,8	P > 0,05	3	39,8 +/- 23,7	65,3 +/- 41,4	P > 0,05
0	111,4 +/- 8,0	113,6 +/- 6,8	P > 0,05	4	28,2 +/- 24,8	58,8 +/- 44,6	P > 0,05
1	106,7 +/- 7,6	106,9 +/- 9,1	P > 0,05	5	15,5 +/- 17,8	48,8 +/- 41,0	P > 0,05
2	104,2 +/- 7,5	106,6 +/- 8,4	P > 0,05	6	9,8 +/- 12,0	52,1 +/- 37,3	P > 0,05
3	98,7 +/- 8,4	101,8 +/- 8,5	P > 0,05	7	5,5 +/- 9,8	41,8 +/- 42,1	P > 0,05
4	94,5 +/- 12,0	95,9 +/- 11,9	P > 0,05	8	3,9 +/- 1,5	50,3 +/- 40,2	P > 0,05
5	91,7 +/- 10,2	90,6 +/- 10,4	P > 0,05	9	0,5 +/- 1,5	40,9 +/- 26,8	P > 0,05
6	89,2 +/- 10,6	88,9 +/- 9,1	P > 0,05	10	0,5 +/- 1,07	30,0 +/- 32,3	P > 0,05

GRIP	TG-WT	TG-KO	TG:WT vs. TG:KO	LICK	TG-WT	TG-KO	TG:WT vs. TG:KO
-5	77,7 +/- 15,1	79,4 +/- 13,9	P > 0,05	-5	9,4 +/- 0,8	9,7 +/- 0,6	P > 0,05
-4	80,9 +/- 11,1	79,4 +/- 16,4	P > 0,05	-4	9,2 +/- 0,8	9,6 +/- 0,7	P > 0,05
-3	78,2 +/- 10,5	81,2 +/- 15,4	P > 0,05	-3	9,2 +/- 0,8	9,5 +/- 0,6	P > 0,05
-2	77,3 +/- 16,4	77,7 +/- 15,2	P > 0,05	-2	9,4 +/- 0,6	9,6 +/- 0,8	P > 0,05
-1	70,5 +/- 12,9	74,1 +/- 11,8	P > 0,05	-1	9,1 +/- 0,9	9,4 +/- 0,7	P > 0,05
0	75,5 +/- 8,6	75,9 +/- 8,7	P > 0,05	0	9,4 +/- 0,5	9,5 +/- 0,3	P > 0,05
1	49,6 +/- 15,3	49,4 +/- 13,4	P > 0,05	1	8,2 +/- 0,6	8,2 +/- 0,6	P > 0,05
2	42,7 +/- 20,3	41,8 +/- 18,1	P > 0,05	2	7,8 +/- 1,0	7,8 +/- 1,0	P > 0,05
3	35,5 +/- 21,8	33,5 +/- 24,2	P > 0,05	3	7,6 +/- 1,2	7,4 +/- 1,1	P > 0,05
4	25,9 +/- 22,2	34,1 +/- 21,5	P > 0,05	4	7,5 +/- 1,2	7,2 +/- 1,1	P > 0,05
5	19,1 +/- 21,1	22,4 +/- 21,1	P > 0,05	5	7,2 +/- 1,1	7,1 +/- 1,2	P > 0,05

5.2.4.2 Quantifizierung von Neurodegeneration und Neuroinflammation

Tabelle 5.2.4.6: Neurodegeneration und Neuroinflammation. RM lumb: lumbales Rückenmark, WT: Wildtyp, TG: SOD1-transgen, KO: RAMP1-Knockout. 0x, 2x, 6x: symptomatische Wochen im PaGE. P: postnataler Tag. Mittelwerte +/- Standardabweichung.

RAMP1 Gehirn	Neurone	Astrozyten	Mikroglia	Lymphozyten
WT:WT (0x/P60)	41,5 +/- 9,0	1,5 +/- 0,4	13,0 +/- 5,3	1,4 +/- 1,0
WT:KO (0x/P60)	41,6 +/- 10,0	2,3 +/- 1,5	13,4 +/- 9,2	1,0 +/- 0,7
TG:WT (0x/P60)	40,6 +/- 8,3	15,8 +/- 2,4	49,3 +/- 22,0	4,0 +/- 1,4
TG:KO (2x/P60)	38,7 +/- 12,7	7,8 +/- 2,2	17,5 +/- 11,7	2,7 +/- 2,1
TG:WT (2x/P90)	31,9 +/- 6,5	6,1 +/- 2,5	30,8 +/- 20,0	7,9 +/- 6,3
TG:KO (6x/P90)	29,7 +/- 8,8	4,1 +/- 1,9	24,1 +/- 12,1	5,4 +/- 5,4
TG:WT (6x/P120)	27,3 +/- 4,9	8,4 +/- 4,0	89,6 +/- 20,8	21,1 +/- 9,1
TG:KO (P120)	21,7 +/- 5,4	11,9 +/- 2,6	74,2 +/- 50,4	6,3 +/- 2,8

RAMP1 RM lumb	Neurone	Astrozyten	Mikroglia	Lymphozyten
WT:WT (0x/P60)	8,9 +/- 1,9	9,7 +/- 2,4	29,0 +/- 6,3	1,2 +/- 0,9
WT:KO (0x/P60)	9,8 +/- 3,1	8,0 +/- 3,8	13,8 +/- 6,0	0,8 +/- 0,8
TG:WT (0x/P60)	5,6 +/- 1,4	13,7 +/- 2,4	17,4 +/- 6,5	0,8 +/- 1,4
TG:KO (2x/P60)	5,7 +/- 2,2	21,9 +/- 5,3	34,9 +/- 19,3	0,9 +/- 0,8
TG:WT (2x/P90)	7,1 +/- 1,9	18,6 +/- 7,2	45,6 +/- 32,5	1,4 +/- 1,5
TG:KO (6x/P90)	5,3 +/- 1,8	22,2 +/- 7,5	72,6 +/- 20,7	1,5 +/- 1,2
TG:WT (6x/P120)	2,1 +/- 0,8	37,6 +/- 10,6	21,3 +/- 6,3	1,6 +/- 1,7
TG:KO (P120)	1,7 +/- 1,3	28,8 +/- 5,3	69,6 +/- 67,6	0,8 +/- 0,7

Tabelle 5.2.4.7: Neurodegeneration und Neuroinflammation. RM: lumbales Rückenmark, WT: Wildtyp, TG: SOD1-transgen, KO: RAMP1-Knockout. 0x, 2x, 6x: symptomatische Wochen im PaGE. P: postnataler Tag. Signifikanzniveaus der Varianzanalyse (Zweiwege-ANOVA).

RAMP1 Gehirn	Neurone	Astrozyten	Mikroglia	Lymphozyten
WT:WT (0x/P60) vs TG:WT (0x/P60)	P > 0.05	P<0.001	P > 0.05	P > 0.05
WT:WT (0x/P60) vs TG:WT (2x/P90)	P > 0.05	P < 0.01	P > 0.05	P > 0.05
WT:WT (0x/P60) vs TG:WT (6x/P120)	P < 0.05	P<0.001	P<0.001	P<0.001
WT:KO (0x/P60) vs TG:KO (2x/P60)	P > 0.05	P < 0.01	P > 0.05	P > 0.05
WT:KO (0x/P60) vs TG:KO (6x/P90)	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
WT:KO (0x/P60) vs TG:KO (P120)	P < 0.01	P<0.001	P<0.001	P > 0.05
TG:KO (2x/P60) vs TG:WT (2x/P90)	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
TG:KO (6x/P90) vs TG:WT (6x/P120)	P > 0.05	P < 0.05	P<0.001	P<0.001
TG:WT (6x/P120) vs TG:KO (P120)	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P<0.001
TG:WT (0x/P60) vs TG:KO (2x/P60)	P > 0.05	P<0.001	P > 0.05	P > 0.05
TG:WT (2x/P90) vs TG:KO (6x/P90)	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
TG:WT (6x/P120) vs TG:KO (P120)	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P<0.001
TG:KO (2x/P60) vs TG:KO (6x/P90)	P > 0.05	P < 0.05	P > 0.05	P > 0.05
TG:KO (2x/P60) vs TG:KO (P120)	P < 0.01	P < 0.05	P < 0.01	P > 0.05
TG:KO (6x/P90) vs TG:KO (P120)	P > 0.05	P<0.001	P < 0.01	P > 0.05
TG:WT (0x/P60) vs TG:WT (2x/P90)	P > 0.05	P<0.001	P > 0.05	P > 0.05
TG:WT (0x/P60) vs TG:WT (6x/P120)	P < 0.05	P<0.001	P < 0.05	P<0.001
TG:WT (2x/P90) vs TG:WT (6x/P120)	P > 0.05	P > 0.05	P < 0.01	P < 0.01
RAMP1 RM				
WT:WT (0x/P60) vs TG:WT (0x/P60)	P<0.001	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
WT:WT (0x/P60) vs TG:WT (2x/P90)	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
WT:WT (0x/P60) vs TG:WT (6x/P120)	P<0.001	P<0.001	P > 0.05	P > 0.05
WT:KO (0x/P60) vs TG:KO (2x/P60)	P<0.001	P < 0.01	P > 0.05	P > 0.05
WT:KO (0x/P60) vs TG:KO (6x/P90)	P<0.001	P < 0.01	P < 0.05	P > 0.05
WT:KO (0x/P60) vs TG:KO (P120)	P<0.001	P<0.001	P < 0.05	P > 0.05
TG:KO (2x/P60) vs TG:WT (2x/P90)	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
TG:KO (6x/P90) vs TG:WT (6x/P120)	P < 0.01	P < 0.01	P > 0.05	P > 0.05
TG:WT (6x/P120) vs TG:KO (P120)	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
TG:WT (0x/P60) vs TG:KO (2x/P60)	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
TG:WT (2x/P90) vs TG:KO (6x/P90)	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
TG:WT (6x/P120) vs TG:KO (P120)	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
TG:KO (2x/P60) vs TG:KO (6x/P90)	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
TG:KO (2x/P60) vs TG:KO (P120)	P<0.001	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
TG:KO (6x/P90) vs TG:KO (P120)	P<0.001	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
TG:WT (0x/P60) vs TG:WT (2x/P90)	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
TG:WT (0x/P60) vs TG:WT (6x/P120)	P<0.001	P<0.001	P > 0.05	P > 0.05
TG:WT (2x/P90) vs TG:WT (6x/P120)	P<0.001	P<0.001	P > 0.05	P > 0.05

5.2.4.3 Quantifizierung Innervationsstatus

Tabelle 5.2.4.8: Innervationsstatus. RM lumb: lumbales Rückenmark, WT: Wildtyp, TG: SOD1-transgen, KO: RAMP1-Knockout. 0x, 2x, 6x: symptomatische Wochen im PaGE. P: postnataler Tag. Signifikanzniveaus der Varianzanalyse (Zweiwege-ANOVA).

Triceps	Number Cluster	Clustersize	Innervation
WT:WT (0x/P60) vs WT:KO (0x/P60)	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
WT:WT (0x/P60) vs TG:WT (2x/P90)	P < 0.05	P > 0.05	P < 0.01
WT:WT (0x/P60) vs TG:WT (0x/P60)	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
WT:WT (0x/P60) vs TG:WT (6x/P120)	P<0.001	P > 0.05	P > 0.05
WT:KO (0x/P60) vs TG:KO (2x/P60)	P < 0.01	P > 0.05	P < 0.05
WT:KO (0x/P60) vs TG:KO (6x/P90)	P<0.001	P > 0.05	P<0.001
TG:WT (2x/P90) vs TG:KO (2x/P60)	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
TG:WT (2x/P90) vs TG:KO (6x/P90)	P<0.001	P > 0.05	P > 0.05
TG:WT (2x/P90) vs TG:WT (6x/P120)	P<0.001	P > 0.05	P > 0.05
TG:KO (2x/P60) vs TG:KO (6x/P90)	P<0.001	P > 0.05	P < 0.05
TG:KO (2x/P60) vs TG:WT (0x/P60)	P < 0.05	P > 0.05	P > 0.05
TG:KO (6x/P90) vs TG:WT (6x/P120)	P > 0.05	P > 0.05	P < 0.01

Quadriceps	Number Cluster	Clustersize	Innervation
WT:WT (0x/P60) vs WT:KO (0x/P60)	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
WT:WT (0x/P60) vs TG:WT (2x/P90)	P<0.001	P > 0.05	P<0.001
WT:WT (0x/P60) vs TG:WT (0x/P60)	P < 0.01	P > 0.05	P > 0.05
WT:WT (0x/P60) vs TG:WT (6x/P120)	P<0.001	P > 0.05	P<0.001
WT:KO (0x/P60) vs TG:KO (2x/P60)	P<0.001	P > 0.05	P < 0.01
WT:KO (0x/P60) vs TG:KO (6x/P90)	P<0.001	P > 0.05	P<0.001
TG:WT (2x/P90) vs TG:KO (2x/P60)	P > 0.05	P < 0.05	P > 0.05
TG:WT (2x/P90) vs TG:KO (6x/P90)	P<0.001	P > 0.05	P > 0.05
TG:WT (2x/P90) vs TG:WT (6x/P120)	P<0.001	P > 0.05	P > 0.05
TG:KO (2x/P60) vs TG:KO (6x/P90)	P<0.001	P > 0.05	P > 0.05
TG:KO (2x/P60) vs TG:WT (0x/P60)	P < 0.05	P > 0.05	P > 0.05
TG:KO (6x/P90) vs TG:WT (6x/P120)	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05

5.2.5 Effekt der PACAP-Deletion im SOD1-Mausmodell

5.2.5.1 Dokumentation der klinischen Symptomatik

Tabelle 5.2.5.1: Relatives Körpergewicht im Zeitverlauf. BW: Körpergewicht (body weight), Links: Mittelwert +/- Standardabweichung in % relativ zum postnatalen Tag (P) 49. Rechts: Signifikanzniveaus der Varianzanalyse (Zweiwege-ANOVA). WT: wildtyp, KO: PACAP-Knockout, TG: SOD1-transgen.

BW	WT-WT	WT-KO	TG-WT	TG-KO	WT:WT vs. WT:KO	WT:WT vs. TG:WT	WT:KO vs. TG:KO	TG:WT vs. TG:KO
P49	100,0 +/- 0,0	100,0 +/- 0,0	100,0 +/- 0,0	100,0 +/- 0,0	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P56	105,7 +/- 6,6	106,5 +/- 5,8	103,4 +/- 12,0	105,6 +/- 3,7	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P63	107,3 +/- 6,8	106,4 +/- 8,2	109,0 +/- 5,6	108,3 +/- 7,2	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P70	110,1 +/- 9,1	109,2 +/- 5,9	110,9 +/- 6,6	109,7 +/- 10,7	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P77	112,5 +/- 8,7	112,1 +/- 4,9	113,6 +/- 7,6	109,6 +/- 9,0	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P84	114,0 +/- 7,3	114,8 +/- 6,6	114,3 +/- 8,2	111,3 +/- 9,4	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P91	118,2 +/- 9,9	115,4 +/- 7,4	117,2 +/- 8,3	110,1 +/- 14,0	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P98	118,8 +/- 9,1	119,5 +/- 6,8	116,2 +/- 7,2	113,0 +/- 11,7	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P105	119,7 +/- 10,6	121,4 +/- 6,2	114,8 +/- 8,1	112,0 +/- 11,8	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P112	123,7 +/- 13,2	119,4 +/- 10,6	107,9 +/- 9,3	109,2 +/- 10,4	P > 0.05	P<0.001	P > 0.05	P > 0.05
P119	124,8 +/- 13,7	124,3 +/- 10,9	103,0 +/- 10,7	108,0 +/- 13,2	P > 0.05	P<0.001	P<0.001	P > 0.05
P126	126,7 +/- 15,4	124,3 +/- 11,4	98,6 +/- 11,8	101,3 +/- 12,6	P > 0.05	P<0.001	P<0.001	P > 0.05
P133	128,1 +/- 13,5	125,8 +/- 13,1	95,6 +/- 11,7	99,9 +/- 13,6	P > 0.05	P<0.001	P<0.001	P > 0.05
P140	130,0 +/- 16,7	120,4 +/- 12,2	95,2 +/- 11,5	95,7 +/- 12,8	P > 0.05	P<0.001	P<0.001	P > 0.05
P147	130,3 +/- 18,4	122,2 +/- 14,2	95,2 +/- 11,5	95,5 +/- 15,1	P > 0.05	P<0.001	P<0.001	P > 0.05

Tabelle 5.2.5.2: Kraftausdauer der Hinterpfote im Zeitverlauf. PAGE: Kraftausdauer (paw grip endurance), Links: Mittelwert +/- Standardabweichung in Sekunden. Rechts: Signifikanzniveaus der Varianzanalyse (Zweiwege-ANOVA). WT: wildtyp, KO: PACAP-Knockout, TG: SOD1-transgen.

PAGE	WT-WT	WT-KO	TG-WT	TG-KO	WT:WT vs. WT:KO	WT:WT vs. TG:WT	WT:KO vs. TG:KO	TG:WT vs. TG:KO
P49	120,0 +/- 0,0	120,0 +/- 0,0	120,0 +/- 0,0	120,0 +/- 0,0	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P56	120,0 +/- 0,0	120,0 +/- 0,0	120,0 +/- 0,0	119,4 +/- 2,5	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P63	120,0 +/- 0,0	120,0 +/- 0,0	120,0 +/- 0,0	118,1 +/- 7,5	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P70	120,0 +/- 0,0	120,0 +/- 0,0	120,0 +/- 0,0	115,9 +/- 16,3	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P77	120,0 +/- 0,0	120,0 +/- 0,0	120,0 +/- 0,0	112,8 +/- 22,1	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P84	120,0 +/- 0,0	120,0 +/- 0,0	116,4 +/- 12,1	113,1 +/- 19,1	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P91	120,0 +/- 0,0	120,0 +/- 0,0	112,3 +/- 25,6	104,1 +/- 30,3	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P98	120,0 +/- 0,0	120,0 +/- 0,0	112,3 +/- 25,6	99,4 +/- 36,8	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P105	120,0 +/- 0,0	120,0 +/- 0,0	102,7 +/- 39,5	84,4 +/- 43,2	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P112	120,0 +/- 0,0	120,0 +/- 0,0	80,5 +/- 55,2	67,8 +/- 41,4	P > 0.05	P > 0.05	P < 0.05	P > 0.05
P119	120,0 +/- 0,0	120,0 +/- 0,0	37,3 +/- 45,6	29,7 +/- 33,6	P > 0.05	P<0.001	P<0.001	P > 0.05
P126	120,0 +/- 0,0	120,0 +/- 0,0	11,4 +/- 36,1	14,7 +/- 34,9	P > 0.05	P<0.001	P<0.001	P > 0.05
P133	120,0 +/- 0,0	120,0 +/- 0,0	0,5 +/- 1,5	8,8 +/- 23,1	P > 0.05	P<0.001	P<0.001	P > 0.05
P140	120,0 +/- 0,0	120,0 +/- 0,0	0,0 +/- 0,0	1,3 +/- 5,0	P > 0.05	P<0.001	P<0.001	P > 0.05
P147	120,0 +/- 0,0	120,0 +/- 0,0	0,0 +/- 0,0	0,0 +/- 0,0	P > 0.05	P<0.001	P<0.001	P > 0.05

Tabelle 5.2.5.3: Maximalkraft der Vorderpfote im Zeitverlauf. GRIP: Maximalkraft (Griffstärke), Links: Mittelwert +/- Standardabweichung in Gramm. Rechts: Signifikanzniveaus der Varianzanalyse (Zweiwege-ANOVA). WT: wildtyp, KO: PACAP-Knockout, TG: SOD1-transgen.

GRIP	WT-WT	WT-KO	TG-WT	TG-KO	WT:WT vs. WT:KO	WT:WT vs. TG-WT	WT:KO vs. TG-KO	TG-WT vs. TG-KO
P49	93,8 +/- 10,2	92,5 +/- 10,6	88,2 +/- 12,5	92,5 +/- 9,3	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P56	92,5 +/- 11,3	95,8 +/- 6,7	82,7 +/- 14,2	93,8 +/- 7,2	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P63	90,0 +/- 13,2	91,7 +/- 10,3	90,0 +/- 11,8	89,4 +/- 14,4	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P70	93,1 +/- 11,4	90,0 +/- 12,8	95,5 +/- 6,9	86,3 +/- 17,1	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P77	91,3 +/- 11,5	92,5 +/- 7,5	91,8 +/- 9,8	88,1 +/- 22,0	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P84	96,9 +/- 7,9	92,5 +/- 9,7	85,5 +/- 19,2	88,1 +/- 23,2	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P91	90,0 +/- 14,6	86,7 +/- 16,7	82,7 +/- 22,4	71,3 +/- 28,3	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P98	88,1 +/- 16,0	88,3 +/- 10,3	80,0 +/- 24,1	62,5 +/- 27,0	P > 0.05	P > 0.05	P < 0.001	P < 0.05
P105	90,6 +/- 11,8	94,2 +/- 9,0	70,0 +/- 15,5	58,1 +/- 20,7	P > 0.05	P < 0.01	P < 0.001	P > 0.05
P112	90,6 +/- 13,9	89,2 +/- 11,6	60,0 +/- 24,9	47,5 +/- 14,8	P > 0.05	P < 0.001	P < 0.001	P > 0.05
P119	88,8 +/- 15,0	96,7 +/- 6,5	35,5 +/- 25,8	33,1 +/- 14,0	P > 0.05	P < 0.001	P < 0.001	P > 0.05
P126	93,1 +/- 9,5	80,8 +/- 34,0	14,6 +/- 16,9	20,0 +/- 17,5	P > 0.05	P < 0.001	P < 0.001	P > 0.05
P133	96,9 +/- 6,0	93,3 +/- 9,8	9,1 +/- 18,1	8,8 +/- 11,5	P > 0.05	P < 0.001	P < 0.001	P > 0.05
P140	97,5 +/- 7,7	97,5 +/- 6,2	7,3 +/- 12,7	10,6 +/- 15,3	P > 0.05	P < 0.001	P < 0.001	P > 0.05
P147	97,5 +/- 5,8	98,3 +/- 5,8	7,3 +/- 12,7	6,3 +/- 12,0	P > 0.05	P < 0.001	P < 0.001	P > 0.05

Tabelle 5.2.5.4: Leckfrequenz der Zunge im Zeitverlauf. LICK: Lecktest, Links: Mittelwert +/- Standardabweichung in Hertz. Rechts: Signifikanzniveaus der Varianzanalyse (Zweiwege-ANOVA). WT: wildtyp, KO: PACAP-Knockout, TG: SOD1-transgen.

LICK	WT-WT	WT-KO	TG-WT	TG-KO	WT:WT vs. WT:KO	WT:WT vs. TG-WT	WT:KO vs. TG-KO	TG-WT vs. TG-KO
P49	9,5 +/- 1,1	9,2 +/- 0,7	8,8 +/- 0,4	8,8 +/- 0,7	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P56	9,8 +/- 0,6	9,5 +/- 0,9	8,7 +/- 0,8	9,0 +/- 0,8	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P63	9,7 +/- 0,9	9,3 +/- 0,5	8,6 +/- 0,6	9,1 +/- 0,7	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P70	9,6 +/- 0,5	9,2 +/- 1,0	8,8 +/- 0,7	9,0 +/- 0,8	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P77	9,9 +/- 0,6	9,2 +/- 1,1	8,9 +/- 0,8	9,1 +/- 0,7	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P84	9,9 +/- 1,0	9,2 +/- 0,7	8,9 +/- 0,5	8,8 +/- 0,7	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P91	9,7 +/- 0,7	9,0 +/- 0,9	9,0 +/- 0,6	8,9 +/- 0,6	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P98	10,1 +/- 0,7	9,5 +/- 0,8	8,9 +/- 0,4	9,1 +/- 0,7	P > 0.05	P < 0.05	P > 0.05	P > 0.05
P105	10,0 +/- 0,7	9,3 +/- 1,1	8,5 +/- 0,9	9,0 +/- 0,7	P > 0.05	P < 0.001	P > 0.05	P > 0.05
P112	9,8 +/- 0,9	9,5 +/- 1,0	8,3 +/- 0,9	8,6 +/- 0,6	P > 0.05	P < 0.001	P > 0.05	P > 0.05
P119	9,8 +/- 0,8	9,5 +/- 0,7	7,5 +/- 1,0	8,6 +/- 0,6	P > 0.05	P < 0.001	P > 0.05	P < 0.05
P126	9,8 +/- 0,8	9,5 +/- 0,7	7,1 +/- 0,9	8,1 +/- 0,7	P > 0.05	P < 0.001	P < 0.001	P < 0.05
P133	10,0 +/- 0,8	9,4 +/- 0,8	6,7 +/- 1,2	8,0 +/- 0,7	P > 0.05	P < 0.001	P < 0.001	P < 0.01
P140	9,8 +/- 0,9	9,0 +/- 1,1	6,7 +/- 1,1	7,8 +/- 1,2	P > 0.05	P < 0.001	P < 0.01	P < 0.05
P147	9,8 +/- 0,8	9,3 +/- 1,0	6,7 +/- 1,1	7,7 +/- 1,2	P > 0.05	P < 0.001	P < 0.001	P < 0.05

Tabelle 5.2.5.5: Angleichung der Symptomstarts. BW: relatives Körpergewicht in %m PAGE: Kraftausdauer der Hinterpfote in Sekunden, GRIP: Maximalkraft der Vorderpfote in Gramm. LICK: Leckfrequenz, Mittelwerte +/- Standardabweichung bzw. Signifikanzniveaus der Varianzanalyse (Zweiwege-ANOVA). 0: Zeitpunkt des Symptomstarts, -1 bis -6: Woche vor Symptomstart, 1-7: Woche nach Symptomstart. WT: wildtyp, KO: PACAP-Knockout, TG: SOD1-transgen.

BW	TG-WT	TG-KO	TG-WT vs. TG-KO	PAGE	TG-WT	TG-KO	TG-WT vs. TG-KO
-6	107,9 +/- 8,5	107,8 +/- 11,5	P > 0.05	-5	120,0 +/- 0,0	120,0 +/- 0,0	P > 0.05
-5	111,5 +/- 6,6	111,1 +/- 8,9	P > 0.05	-4	120,0 +/- 0,0	120,0 +/- 0,0	P > 0.05
-4	112,2 +/- 7,3	111,7 +/- 9,0	P > 0.05	-3	120,0 +/- 0,0	118,1 +/- 7,5	P > 0.05
-3	114,0 +/- 7,6	111,7 +/- 9,7	P > 0.05	-2	120,0 +/- 0,0	120,0 +/- 0,0	P > 0.05
-2	116,2 +/- 9,8	113,2 +/- 9,8	P > 0.05	-1	120,0 +/- 0,0	115,6 +/- 10,3	P > 0.05
-1	114,2 +/- 6,8	111,8 +/- 8,0	P > 0.05	0	120,0 +/- 0,0	120,0 +/- 0,0	P > 0.05
0	118,0 +/- 7,7	114,6 +/- 9,4	P > 0.05	1	49,1 +/- 42,4	78,1 +/- 33,2	P > 0.05
1	112,6 +/- 7,1	107,6 +/- 10,1	P > 0.05	2	7,3 +/- 12,3	38,4 +/- 26,6	P > 0.05
2	106,2 +/- 7,3	105,2 +/- 11,0	P > 0.05	3	3,6 +/- 10,5	25,3 +/- 32,1	P > 0.05
3	100,4 +/- 11,4	101,3 +/- 7,8	P > 0.05	4	0,5 +/- 1,5	19,1 +/- 30,0	P > 0.05
4	97,9 +/- 11,9	100,3 +/- 9,9	P > 0.05	5	0,0 +/- 0,0	10,3 +/- 24,7	P > 0.05
5	96,5 +/- 11,0	100,0 +/- 11,2	P > 0.05	6	0,0 +/- 0,0	3,4 +/- 11,4	P > 0.05
6	94,5 +/- 11,4	98,9 +/- 13,4	P > 0.05	7	0,0 +/- 0,0	0,0 +/- 0,0	P > 0.05

GRIP	TG-WT	TG-KO	TG-WT vs. TG-KO	LICK	TG-WT	TG-KO	TG-WT vs. TG-KO
-5	91,8 +/- 11,7	93,8 +/- 8,9	P > 0.05	-5	8,8 +/- 0,4	8,9 +/- 0,6	P > 0.05
-4	90,9 +/- 13,8	91,9 +/- 9,1	P > 0.05	-4	9,0 +/- 0,7	9,0 +/- 0,5	P > 0.05
-3	92,7 +/- 10,1	91,3 +/- 10,2	P > 0.05	-3	8,6 +/- 0,3	8,8 +/- 0,6	P > 0.05
-2	92,7 +/- 11,0	78,8 +/- 28,7	P > 0.05	-2	8,8 +/- 0,4	9,0 +/- 0,7	P > 0.05
-1	87,3 +/- 11,9	88,1 +/- 13,3	P > 0.05	-1	9,0 +/- 0,4	8,9 +/- 0,6	P > 0.05
0	83,6 +/- 13,6	86,3 +/- 12,0	P > 0.05	0	9,3 +/- 0,6	9,2 +/- 0,5	P > 0.05
1	45,5 +/- 12,9	51,9 +/- 9,8	P > 0.05	1	8,4 +/- 0,7	8,3 +/- 0,6	P > 0.05
2	32,7 +/- 25,7	43,8 +/- 8,9	P > 0.05	2	8,0 +/- 1,0	8,0 +/- 1,1	P > 0.05
3	23,6 +/- 23,8	29,4 +/- 18,8	P > 0.05	3	7,8 +/- 1,4	7,9 +/- 1,1	P > 0.05
4	20,0 +/- 21,4	20,6 +/- 21,1	P > 0.05	4	7,4 +/- 1,4	8,0 +/- 1,1	P > 0.05
5	8,2 +/- 16,0	11,9 +/- 15,2	P > 0.05	5	7,2 +/- 1,3	7,8 +/- 1,1	P > 0.05
6	2,7 +/- 4,7	5,6 +/- 10,9	P > 0.05				
7	0,0 +/- 0,0	5,0 +/- 12,1	P > 0.05				

5.2.5.2 Quantifizierung von Neurodegeneration und Neuroinflammation

Tabelle 5.2.5.6.: Neurodegeneration und Neuroinflammation. RM: lumbales Rückenmark, WT: Wildtyp, TG: SOD1-transgen, KO: RAMP1-Knockout. 0x, 2x, 6x: symptomatische Wochen im PaGE. P: postnataler Tag. Mittelwerte +/- Standardabweichung.

PACAP Gehirn	Neurone	Astrozyten	Mikroglia	Lymphozyten
WT:WT (früh)	44,2 +/- 6,3	15,9 +/- 3,0	22,0 +/- 9,1	2,5 +/- 1,8
WT:KO (früh)	48,3 +/- 6,1	15,2 +/- 2,5	26,8 +/- 10,0	3,4 +/- 1,1
TG:WT (früh)	40,7 +/- 8,2	15,5 +/- 2,8	49,4 +/- 22,2	3,8 +/- 1,4
TG:KO (früh)	41,1 +/- 5,4	16,4 +/- 3,8	53,0 +/- 23,0	5,8 +/- 2,7
WT:WT (spät)	44,2 +/- 6,3	16,0 +/- 3,1	22,0 +/- 9,0	2,6 +/- 1,8
WT:KO (spät)	48,2 +/- 6,2	15,1 +/- 2,5	26,9 +/- 9,9	3,3 +/- 1,2
TG:WT (spät)	27,9 +/- 5,2	31,7 +/- 3,8	91,8 +/- 27,3	22,7 +/- 9,9
TG:KO (spät)	20,0 +/- 7,7	29,0 +/- 5,2	192,8 +/- 53,3	14,9 +/- 5,4

PACAP RM lumb	Neurone	Astrozyten	Mikroglia	Lymphozyten
WT:WT (früh)	7 +/- 1,4	19,1 +/- 6,1	14,1 +/- 3,7	0,6 +/- 0,6
WT:KO (früh)	6,8 +/- 1,3	19,3 +/- 3,3	13,7 +/- 5,6	0,6 +/- 0,6
TG:WT (früh)	5,4 +/- 1,0	38,0 +/- 8,8	18,7 +/- 7,1	1,3 +/- 1,5
TG:KO (früh)	6,7 +/- 1,7	37,6 +/- 13,7	21,5 +/- 5,9	1,6 +/- 1,5
WT:WT (spät)	6,9 +/- 2,0	11,7 +/- 3,5	11,7 +/- 3,9	0,4 +/- 0,5
WT:KO (spät)	8,4 +/- 1,4	11,9 +/- 2,4	12,4 +/- 3,9	0,5 +/- 0,6
TG:WT (spät)	2,7 +/- 1,3	64,2 +/- 11,6	23,4 +/- 5,1	4,0 +/- 3,3
TG:KO (spät)	2,6 +/- 1,5	66,5 +/- 7,8	68,1 +/- 16,2	3,4 +/- 1,8

Tabelle 5.2.5.6.: Neurodegeneration und Neuroinflammation. RM: lumbales Rückenmark, WT: Wildtyp, TG: SOD1-transgen, KO: RAMP1-Knockout. 0x, 2x, 6x: symptomatische Wochen im PaGE. P: postnataler Tag. Signifikanzniveaus der Varianzanalyse (Zweiwege-ANOVA).

PACAP Gehirn	Neurone	Astrozyten	Mikroglia	Lymphozyten
WT:WT früh vs WT:WT spät	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
WT:KO früh vs WT:KO spät	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
TG:WT früh vs TG:WT spät	P < 0.01	P < 0.001	P < 0.05	P < 0.001
TG:KO früh vs TG:KO spät	P < 0.001	P < 0.001	P < 0.001	P < 0.05
WT:WT früh vs WT:KO früh	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
TG:WT früh vs TG:KO früh	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
WT:WT spät vs WT:KO spät	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
TG:WT spät vs TG:KO spät	P > 0.05	P > 0.05	P < 0.001	P > 0.05
WT:WT früh vs TG:WT früh	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
WT:KO früh vs TG:KO früh	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
WT:WT spät vs TG:WT spät	P < 0.001	P < 0.001	P < 0.001	P < 0.001
WT:KO spät vs TG:KO spät	P < 0.001	P < 0.001	P < 0.001	P < 0.01

PACAP RM lumb	Neurone	Astrozyten	Mikroglia	Lymphozyten
WT:WT früh vs WT:WT spät	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
WT:KO früh vs WT:KO spät	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
TG:WT früh vs TG:WT spät	P < 0.001	P < 0.001	P > 0.05	P < 0.05
TG:KO früh vs TG:KO spät	P < 0.001	P < 0.001	P < 0.001	P > 0.05
WT:WT früh vs WT:KO früh	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
TG:WT früh vs TG:KO früh	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
WT:WT spät vs WT:KO spät	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
TG:WT spät vs TG:KO spät	P > 0.05	P > 0.05	P < 0.001	P > 0.05
WT:WT früh vs TG:WT früh	P > 0.05	P < 0.01	P > 0.05	P > 0.05
WT:KO früh vs TG:KO früh	P > 0.05	P < 0.001	P > 0.05	P > 0.05
WT:WT spät vs TG:WT spät	P < 0.001	P < 0.001	P < 0.01	P < 0.01
WT:KO spät vs TG:KO spät	P < 0.001	P < 0.001	P < 0.001	P < 0.05

5.3 Abkürzungsverzeichnis

Phyikalische Einheiten:		bp	Basenpaare
		°C	Grad Celsius
		d	Tage (dies)
		Da	Dalton
		g	Gramm
		g	Graviatation, Erdanziehung 9,81 m/s ²
		h	Stunden (horae)
		Hz	Hertz (1/s)
		k	kilo
		l	Liter
		M	Mol
		m	Meter, milli
		min	Minuten
		μ	micro
		n	nano
		rpm	Umdrehungen (<i>rotations</i>) pro Minute
		s	Sekunden
		U	Unit
		V	Volt
AC	Adenylat-Zyklase	CT	Calcitonin
ACh	Achetylcholin	Cu	elementares Kupfer
AK	Antikörper	d.h.	das heißt
ALS	amyotrophe Lateral-sclerose	DAB	Diaminobenzidin
AM	Adrenomedullin	DAG	Diacylglycerol
AMPA	2-amino-3-(5-methyl-3-oxo-1,2-oxazol-4-yl)propanoic acid	DIG	Digoxigenin
Aq.dest	destilliertes Wasser	DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
as	antisense	DNA	Desoxyribonukleinsäure
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat	dNTP	desoxy-Nukleotid-triphosphate
Btx	Bungarotoxin	EAAT	<i>excitatory amino acid transporter</i>
bzw.	beziehungsweise	EP	Endplatte
Ca	elementares Calcium	fALS	familiäre ALS
cAMP	zyklisches Adenosin-monophosphat	FF	<i>fast fatiguable</i>
CD3	<i>Cluster of differentiation 3</i>	FR	<i>fast fatigue-resistant</i>
CGRP	<i>Calcitonin gene-related peptide</i>	FTD	frontotemporale Demenz
ChAT	Colinacetyltransferase	FUS	<i>Fused in Sarcoma</i>
Cl	elementares Chlor	GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
CREB	<i>cAMP responding element</i>	GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
CRLR	<i>calcitonin receptor like receptor</i>	GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
Csf1-R	<i>colony stimulating factor 1-Rezeptor</i>	HRP	Merrettich (<i>horseradisch</i>) Peroxidase
		Iba	<i>ionized calcium binding adaptor molecule</i>

ID	Identität	RAMP	<i>receptor activity modify-</i>
IFN	Interferon		<i>ing protein</i>
Ig	Immunglobulin	RCP	<i>receptor component pro-</i>
IHC	Immunhistochemie		<i>tein</i>
III	Ncl. oculomotorius	RNA	Ribonukleinsäure
IL	Interleukin	ROS	<i>reactive oxygen species</i>
IP3	Inositoltriphosphat	RT	Raumtemperatur
IPTG	Isopropyl- β -D-thio- galactopyranosid	sALS	sporadische ALS
		SOD1	Superoxiddismutase
IR	Immunoreaktivität	SP	Substanz P
ISH	<i>in situ</i> -Hybridisierung	SR	<i>slow fatigue-resistant</i>
IV	Ncl. trochlearis	TDP	TAR DNA <i>binding pro-</i>
KO	<i>Knockout</i>		<i>tein</i>
LPS	Lipopolysaccharid	TG	transgen
MAP2	Mikrotubuli assoziiertes Protein 2	TH	Tyrosinhydroxylase
		Th	T Helferzellen
MAPK	Mitogenaktivierte Protein- kinase	TNF	Tumornekrosefaktor
		Treg	regulatorische T-Zelle
Mg	elementares Magnesium	TSA	Tyrosin-Signal-
MN	Motoneuron		amplifikation
Mn	elementares Mangan	u.a.	unter anderem
mRNA	<i>messenger</i> -RNA	u.U.	unter Umständen
N. / n.	Nervus	V	Ncl. motorius n. trigemini
Na	elementares Natrium	VACHT	vesikulärer Acetylcholin-
Ncl.	Nucleus		transporter
NF200	Neurofilament	VGlut	vesikulärer Glutamat-
Ni	elementares Nickel		transporter
NMDA	N-methyl-D-Aspartat	VI	Ncl. abducens
NO	Stickstoffmonoxid	VIAAT	<i>vesikulärer inhibitorischer</i>
NPY	Neuropeptid Y		<i>amino acid transporter</i>
NTB	4-Nitroblue-Tetrazol- Chlorid	VII	Ncl. facialis
		VIP	Vasoaktives Intestinales
OD	optische Dichte		Peptid
P	postnataler Tag	VPAC	VIP/PACAP-Rezeptor
PAC-1	PACAP-Rezeptor	vs.	versus
PACAP	<i>pituitary adenylate cyclase-</i> <i>activating polypeptide</i>	Wdh.	Wiederholung
		WT	Wildtyp
PaGE	<i>paw grip endurance</i>	Xa	Ncl. ambiguus n. vagi
PCR	Polymerasekettenreaktion	Xd	Ncl. dorsalis n. vagi
PKA	Proteinkinase A	XII	Ncl. hypoglossus
PKC	Proteinkinase C	z.B.	zum Beispiel
PLD	Phospholipase D	Zn	elementares Zink
PNS	peripheres Nervensystem	ZNS	Zentralnervensystem

Curriculum Vitae

Cornelia Ringer

Privat

Ernst-Giller-Str.24
35039 Marburg
Tel: 06421-608744
E-mail: ringerc@staff.uni-marburg.de

Beruflich

Philipps-Universität Marburg
Robert-Koch-Straße 8
35032 Marburg
Tel: 06421-28-66778

ZUR PERSON

geboren am **11.06.1982** in **Rotenburg an der Fulda**

Vater: Manfred Ringer, 21.08.1955, Studienrat

Mutter: Christiane Ringer, geb. König, 27.04.1956

AUSBILDUNG

Seit 12/2007

Philipps-Universität Marburg

Doktorandin am Fachbereich Medizin

- Dissertationsthema:
„Die Rolle der Neuropeptide Calcitonin gene-related Peptide und Pituitary adenylate cyclase-activating Peptide im Krankheitsverlauf der amyotrophen Lateralsklerose“
- Betreuer: PD. Dr. Burkhard Schütz

10/2001 – 06/2007

Philipps-Universität Marburg

Studium der Humanbiologie

- Diplomarbeit: „Die Rolle des *Calcitonin gene-related peptide* im Superoxiddismutase 1-Mausmodell der amyotrophen Lateralsklerose“, Note: 1,0
- Hauptfach: Neurobiologie, Note: 1,3
- Nebenfach: Zellbiologie, Note: 1,0

07/1992 - 06/2001

Jakob-Grimm-Schule Rotenburg an der Fulda

- Besuch des Gymnasialzweiges mit Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife mit Leistungskursen Chemie und Biologie, 3. und 4. Prüfungsfach: Deutsch und Ethik

**BERUFLICHER
WERDEGANG**

Seit 12/2007

Philipps-Universität Marburg
Institut für Anatomie und Zellbiologie,
AG Molekulare Neurowissenschaften (Prof. Weihe)
 Wissenschaftliche Mitarbeiterin

- Umsetzung des Dissertationsprojektes
- Einbindung in die Lehre (Betreuung von Einzel- und Gruppenpraktika)
- Einbindung in das Kooperationsprojekt mit dem UGMLC (Uniklinikum Gießen-Marburg *Lung Center*)

09/2004– 04/2005

Philipps-Universität Marburg
Institut für Germanistische Sprachwissenschaft
AG Neurolinguistik (Prof. Matthias Schlesewsky)
 Studentische Hilfskraft

- Durchführung mehrerer EEG- und Fragebodenstudien zum Sprachverstehen im Deutschen

10/2003-04/2006

Philipps-Universität Marburg
Institut für Anatomie und Zellbiologie und
Institut für Zytologie und Zytopathologie
 Studentische Hilfskraft

- Tutorin im anatomischen Präparierkurs für Humanbiologen Im WS 03/04, WS 04/05, WS 05/06
- Tutorin in der Übung Histologie für Humanbiologen SS 03
- Tutorin im Seminar für Biochemie SS 04

PRAKTIKA

07/2005 – 08/2005

Max-Planck-Institut für *Cognitive and Brain Science*, Leipzig
AG Neurotypologie (Dr. Ina Bornkessel)

- Auswertung von MRT-Studien zum Sprachverstehen im Deutschen

07/2007 – 08/2007

Ressort für Wissenschaft und Medizin des *stern*
Redaktionspraktikum im Verlag Gruner & Jahr AG, Hamburg

- Recherche und Verfassen eines populärwissenschaftlichen Artikels zum Thema Alptraumtherapie
- Mitarbeit an der Recherche für mehrere andere Artikel

PUBLIKATIONEN

peer reviewed:

Ringer C, Weihe E, Schütz B. “*Calcitonin gene-related peptide expression levels are a predictor of motor neuron vulnerability in SOD1-G93A mice, a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis.*” Neurobiol Dis. 2011 (Sept. 21, Epub ahead of print).

Fuchs A, **Ringer C**, Bilkei-Gorzo A, Weihe E, Roeper J, Schütz B. “*Downregulation of the potassium chloride cotransporter KCC2 in vulnerable motoneurons in the SOD1-G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis*”. J Neuropathol Exp Neurol. 2010 Oct;69(10):1057-70

Ringer C, Weihe E, Schütz B. “*Pre-symptomatic alterations in subcellular betaCGRP distribution in motor neurons precede astrogliosis in ALS mice*”. Neurobiol Dis. 2009 Aug;35(2):286-95.

abstract:

18th International Symposium on ALS/MND, 12/2008 in Toronto

Ringer C, Weihe E, Schütz B.: „*Calcitonin gene-related peptide is a marker for early pre-symptomatic motor neuron pathology in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis.*“

European Neuropeptide Club Meeting, 04/2008 in Ferrara (Italien)

Ringer C, Weihe E, Schütz B.: „*Altered presymptomatic localisation of β CGRP in motor neurons precedes astrogliosis in ALS.*“

40th Meeting der Society for Neuroscience, 11/2010 in San Diego (USA)

Ringer C, Weihe E, Schütz B.: “*Calcitonin gene-related peptide expression differentiates resistant from vulnerable motoneurons in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis.*”

21th International Symposium on ALS/MND, 12/2010 in Orlando (USA)

Ringer C, Weihe E, Schütz B.: “*Calcitonin gene-related peptide expression differentiates resistant from vulnerable motoneurons in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis.*”

9th Meeting der ENCALS, 05/2011 in Hannover

Ringer C, Weihe E, Schütz B.: “*Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide deficiency delays tongue motor function deficits and prolongs survival in the SOD1-G93A mouse model of ALS.*”

41th Meeting der Society for Neuroscience, 11/2011 in Washington D.C.

Ringer C, Weihe E, Schütz B.: “*PACAP-deficiency extends survival and causes a switch of microglial phenotype in the SOD1(G93A) mouse model of ALS.*”

22th International Symposium on ALS/MND, 12/2011 in Sydney

Ringer C, Weihe E, Schütz B.: “*PACAP-deficiency extends survival and causes a switch of microglial phenotype in the SOD1(G93A) mouse model of ALS.*”

FÖRDERUNGEN

12/2007	GlaxoSmithKline-Stiftung Förderung einer Kongressreise zur Vorstellung der Ergebnisse der Diplomarbeit Fördersumme: 1.000€
08/2008 – 12/2010	Stiftung P.E.Kempkes der Philipps-Universität Marburg „Der Einfluss eines RAMP1-Knockouts auf den Krankheitsverlauf im SOD1-Mausmodell der amyotrophen Lateralsklerose.“ Fördersumme: 15.000€
08/2008 – 08/2010	Universitätsklinikum Gießen und Marburg (UKGM) „Das Neuropeptid CGRP als Pathogenesefaktor der amyotrophen Lateralsklerose.“ Fördersumme: 20.000€
10/2011	GlaxoSmithKline-Stiftung Förderung einer Kongressreise zur Vorstellung der Ergebnisse der Doktorarbeit Fördersumme: 800€

**AUSZEICHNUNGEN
UND PREISE**

04/2008	Best Poster Award (1.Platz): European Neuropeptide Club Meeting, 04/2008 in Ferrara (Italien) Ringer C, Weihe E, Schütz B.: „ <i>Altered presymptomatic localisation of βCGRP in motor neurons precedes astrogliosis in ALS.</i> “
03/2011	Promotionspreis (1.Platz) Dissertationswettbewerb Neurologie des FB Medizin der Philipps-Universität im Rahmen der <i>Brain Awareness Week</i> 2011

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren Damen/Herren:

Bastians	Lill
Bauer	Liss
Bernd	Löffler
Bette	Lohoff
Dalpke	Lorberth
Daut	Lüers
Del Rey	Meißner
Dietrich	Moll
Eickmann	Müller
Eilers	Müller-Brüsselbach
Elsässer	Plant
Feußner	Renkawitz-Pohl
Garn	Renz
Garten	Röhm
Gudermann	Röper
Hasilik	Schäfer
Hassel	Schlesewsky
Huber	Schrader
Jacob	Schulz
Jungclas	Schütz
Kirchner	Steiniger
Klenk	Stöckmann
Knöller	Suske
Koolmann	Voigt
Krebber	Weihe
Kunz	Westermann
Lang	

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Cornelia Ringer aus Rotenburg an der Fulda, ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Die Rolle der Neuropeptide *Calcitonin gene-related Peptide* und *Pituitary adenylate cyclase-activating Polyptide* im Superoxiddismutase 1 Mausmodell der amyotrophen Lateralsklerose“ der Abteilung Molekulare Neurowissenschaften am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Philipps-Universität Marburg unter Leitung von PD Dr. Burkhard Schütz ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher weder an einem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Teile der vorliegende Arbeit wurden (oder werden) in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

Als Artikel in Fachzeitschriften:

Ringer C, Weihe E, Schütz B. “*Pre-symptomatic alterations in subcellular betaCGRP distribution in motor neurons precede astrogliosis in ALS mice*”. *Neurobiol Dis.* 2009 Aug;35(2):286-95.

Fuchs A, **Ringer C**, Bilkei-Gorzo A, Weihe E, Roeper J, Schütz B. “*Downregulation of the potassium chloride cotransporter KCC2 in vulnerable motoneurons in the SOD1-G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis*”. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2010 Oct;69(10):1057-70

Ringer C, Weihe E, Schütz B. “*Calcitonin gene-related peptide expression levels are a predictor of motor neuron vulnerability in SOD1-G93A mice, a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis.*” *Neurobiol Dis.* 2011 (Sept. 21, Epub ahead of print).

Als Abstract bzw. Posterpräsentationen auf Fachkongressen:

40th Meeting der Society for Neuroscience, 11/2010 in San Diego (USA) und 21th International Symposium on ALS/MND, 12/2010 in Orlando (USA): **Ringer C**, Weihe E, Schütz B.: “*Calcitonin gene-related peptide expression differentiates resistant from vulnerable motoneurons in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis.*”

9th Meeting der ENCALS, 05/2011 in Hannover: **Ringer C**, Weihe E, Schütz B.: “*Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide deficiency delays tongue motor function deficits and prolongs survival in the SOD1-G93A mouse model of ALS.*”

41th Meeting der Society for Neuroscience, 11/2011 in Washington D.C. und 22th International Symposium on ALS/MND, 12/2011 in Sydney: **Ringer C**, Weihe E, Schütz B.: “*PACAP-deficiency extends survival and causes a switch of microglial phenotype in the SOD1(G93A) mouse model of ALS.*”

Marburg, den _____

Cornelia Ringer

Danksagung

Zum Abschluss meiner Dissertation möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die auf die ein oder andere Weise am Gelingen dieser Arbeit mitgewirkt haben. Mein Dank gilt insbesondere:

PD Dr. Burkhard Schütz für die freundschaftliche und kompetente Betreuung während meiner Zeit am Institut und die vielen wegweisenden Ratschläge, ohne die das erfolgreiche Gelingen und der reibungslose Ablauf dieser Arbeit nicht möglich gewesen wären.

Prof. Dr. Eberhard Weihe für die Bereitstellung und Finanzierung der Doktorandenstelle in seiner Arbeitsgruppe und den ein oder anderen methodischen Hinweis, der sehr hilfreich für das Vorankommen dieser Arbeit war.

Dem **Uniklinikum Gießen-Marburg (UKGM)** und der **Stiftung P. E. Kempkes** für die Bereitstellung der Sachmittelfinanzierung, ohne die diese Arbeit nicht hätte durchgeführt werden können.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der Abteilung Molekulare Neurowissenschaften für ihre stets freundliche und hilfsbereite Unterstützung in fachlichen Belangen, ebenso wie für das angenehme und oft erheiternde Arbeitsklima: **PD Dr. Michael Bette, Andrea Fuchs, Heidi Hlawaty, Norman Kalmbach, Martin Kietz, Kerstin Kloog, Petra „Latti“ Lattermann, Silke Müller, Heike Reichert-Preibsch, Dr. Martin Schäfer, Heidemarie Kuhl, Franziska Petermann, Annette Rossmann, Volker Springmann, Michael Schneider, Uwe Schneider, Annette Seip, Petra Unverzagt, PD Dr. Reiner Westermann**, und insbesondere **Dr. Mirjam Bertoune, Barbara Wiegand und Marion Zibuschka**, auf deren theoretische und praktische Mithilfe bei meinen Experimenten ich mich stets verlassen konnte.

Meinen Kommilitonen und Freunden **Nina Bonekamp, Eva Borger, Stephanie Brand, Anja Klussmeier**, sowie meiner Partnerin **Sarah Tune** für ihre (digitale) Gesellschaft beim Schreiben und fleißiges Korrekturlesen.